

TANIA SILA CAMPIONI

OBTENÇÃO DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO DA FRAÇÃO CELULÓSICA DE
RESÍDUOS SÓLIDOS DA PALMA PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Subprojeto C-2 – Tratamento Enzimático de Resíduos da Palma

Projeto BIOPAL – Vale S. A.

CURITIBA, 2014

TANIA SILA CAMPIONI

OBTENÇÃO DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO DA FRAÇÃO CELULÓSICA DE
RESÍDUOS SÓLIDOS DA PALMA PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Subprojeto C-2 – Tratamento Enzimático de Resíduos da Palma

Projeto BIOPAL – Vale S. A.

Documento apresentado para o exame de Qualificação do Mestrado em
Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia do Programa
de Pós-Graduação em Engenharia Bioprocessos e Biotecnologia,
Setor de Tecnologia da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciana Porto de
Souza Vandenberghe
Co-orientador: Prof^o Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA, 2014

AGRADECIMENTOS

A Deus que me proporcionou saúde, força e sabedoria para vencer mais esta etapa de minha vida.

A minha família (Rose, Edson e Karina) e ao meu namorado (Victor Hugo), por estarem ao meu lado sempre.

À empresa Vale S.A. que financiou e apoiou o projeto Biopal, nos dando suporte para a pesquisa em convênio com a UFPR (LPB) e o CNPq, igualmente importantes.

À Prof^a Luciana Vandenberghe, pela orientação, confiança e disposição durante o desenvolvimento do trabalho.

À Prof^a Adenise e à Joana Antunes pela ajuda com as análises realizadas no cromatógrafo.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR pelas análises realizadas no microscópio de varredura eletrônica.

Ao Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da UFPR pelas análises químicas do resíduo.

Aos meus amigos do Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB I e II), pela amizade e colaboração durante estes dois anos. Agradeço ao Marcelo Maceno em especial, por toda a paciência, dedicação, e apoio, para que fosse possível caminharmos juntos no projeto.

A todas as pessoas que, de maneira direta ou indireta, fizeram parte integrante deste processo, *MUITO OBRIGADA!*

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido no contexto do projeto intitulado “**BIOPAL – Biorefinarias Integradas ao Processamento Sustentável da Palma - Subprojeto Rota Biológica**”, com o suporte financeiro da empresa Vale S.A. O projeto global visa o reaproveitamento dos resíduos do processamento da palma em um processo integrado com a aplicação do conceito de biorrefinaria.

A produção em grande escala do etanol celulósico de 2ª geração possui alguns desafios a serem vencidos. São eles: obter um substrato puro em celulose, sem hemicelulose e lignina, aumentar a eficiência da hidrólise da celulose rendimento glicosídico, melhorar a fermentabilidade do hidrolisado e reduzir custos para tornar o processo viável economicamente. Grande quantidade de palma vem sendo produzida no Brasil e com isso a geração de resíduos e o seu impacto aumentam. Um dos resíduos gerados são os cachos de frutos vazios ou *empty fruit bunches* (EFB). O objetivo deste trabalho foi otimizar as condições da hidrólise enzimática do resíduo EFB, após pré-tratamento físico químico, para obtenção de um hidrolisado rico em glicose e subsequente fermentação para a produção de bioetanol. Para isso foram realizados pré-tratamentos consecutivos: o ácido com HCl (2,5%) e o básico com NaOH (5%), para a hidrólise da hemicelulose e lignina, respectivamente, deixando a celulose mais susceptível à hidrólise enzimática. Ambos os tratamentos foram conduzidos em autoclave a 121°C por 60 min. Após o pré-tratamento básico, lavagens sucessivas com água deionizada no resíduo foram realizadas com o objetivo de remover os compostos inibidores, previamente à hidrólise enzimática. Otimizações das condições de hidrólise enzimática tais como concentração de enzimas, concentração de substrato (EFB ou Avicel-celulose cristalina) e tempo de reação foram realizadas, utilizando dois complexos enzimáticos diferentes, um composto somente por Cellic CTec2 e outro por Celluclast 1.5L em conjunto com Novozymes 188. A produção de etanol celulósico foi realizada pelo processo de sacarificação e fermentação separado (SHF) do hidrolisado obtido após escalonamento da hidrólise enzimática dos EFBs pré-tratados em condições otimizadas. Por meio de análises em MEV, foi possível observar que o pré-tratamento utilizado foi responsável por fragilizar as fibras de celulose, tornando-as mais acessíveis às enzimas. Além disso, a sílica presente nas fibras foi eliminada após o pré-tratamento. Após lavagens sucessivas os compostos inibidores foram retirados da fibra, ambos para melhorar a hidrólise enzimática. O pré-tratamento ácido-básico foi responsável pela hidrólise de 96,3% de hemicelulose e 49% de lignina. Depois de etapas de otimização das condições da hidrólise enzimática foi possível obter 64,9 g/L de glicose, com um rendimento de 63,5% de conversão da celulose presente no EFB pré-tratado em glicose. Estes resultados foram alcançados com 2,2% enzima Cellic CTec2, 15% de EFB pré-tratado e 39 h de

hidrólise em banho-maria agitado a 50°C e 100 rpm. O escalonamento das condições citadas gerou um hidrolisado com 72,2 g/L de glicose e 68,8% de conversão da celulose, um aumento de 11,2% da concentração de glicose no hidrolisado. Este hidrolisado foi utilizado na SHF para produção de etanol chegando-se a 16,6 g/L de glicose após 48 h. Com base nestes dados pode-se afirmar que o resíduo sólido (cachos de frutos vazios) da indústria brasileira de óleo de palma, conhecido como EFB, pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de etanol celulósico de 2ª geração. Outros subprodutos gerados no pré-tratamento tais como, o hidrolisado da hemicelulose e da lignina solúvel, podem ser utilizados no contexto de uma biorrefinaria integrada.

Palavras-chave: EFB, pré-tratamento, otimização da hidrólise enzimática, etanol de 2ª geração, biorrefinaria

ABSTRACT

This work was developed in the context of the project entitled "Biopal - Integrated Biorefineries to Sustainable Processing of Palm - Route Biological Activity", with the financial support of Vale S.A. The global project aims at the reuse of wastes from the processing of palm oil on an integrated process with applying the concept of biorefineries.

The large scale production of second generation ethanol has some challenges to overcome. They are: to obtain a pure cellulose substrate without hemicellulose and lignin, to increase the efficiency of cellulose hydrolysis and the yield glycoside, to improve the fermentability of the hydrolyzate, and to reduce cost of the process to make the process economically viable. Lots of palm has been produced in Brazil and thus the generation of waste and its impact increases. One of the waste generated is the empty fruit bunches (EFB). The aim of this study was to optimize the conditions for enzymatic hydrolysis of EFB residue after physicochemical pretreatment to obtain a rich hydrolyzed into glucose, and subsequent fermentation, to production of bioethanol. For this, consecutive pretreatments were carried out: the acid with HCl (2.5%), and the basic with NaOH (5%), for the removal of hemicellulose and lignin, respectively, leaving the pulp more susceptible to enzymatic hydrolysis. Both treatments were conducted in an autoclave at 121°C and 60 min. After the basic pretreatment, successive washes with deionized water were performed in the solid residue in order to remove inhibitors compounds, prior to enzymatic hydrolysis compounds. Optimizations of enzymatic hydrolysis conditions such as enzyme concentration, substrate concentration (EFB or crystalline cellulose Avicel), and reaction time, were performed using two different enzyme complex, one compound only by Cellic CTec2, and another by Celluclast 1.5L together with Novozymes 188. The production of cellulosic ethanol was performed by separate saccharification and fermentation (SHF), of the hydrolyzate obtained after sacaling the enzymatic hydrolysis of pretreated EFBs under optimized conditions. Through SEM analysis, it was observed that the pretreatment used was responsible for undermining the cellulose fibers, making them more accessible to enzymes. Furthermore, this silica was removed from the fibers after pretreatment. After successive washings inhibitory compounds were removed from the fiber, both to improve enzymatic hydrolysis. The acid-basic pretreatment was responsible for the hydrolysis of 96.3% hemicellulose and 49% lignin. After the optimization steps of the conditions of enzymatic hydrolysis was possible to obtain 64.9 g/L of glucose, with a yield of 63.5% conversion of the cellulose present in the pretreated EFB in glucose. These results were achieved with 2.2% enzyme Cellic CTec2, 15% of EFB pretreated and 39 h of hydrolysis in stirred tank at 50° C and 100 rpm. The analysis of the conditions mentioned generated one hydrolyzate with 72.2 g/L glucose and 68.8% conversion of cellulose, a 11.2% increase in glucose concentration in the hydrolyzate. This hydrolyzate was used in the SHF for ethanol production reached to 16.6 g/L of glucose after 48 h. Based on these data it can be stated that the solid waste (EFB) of the Brazilian industry of palm oil, can be used as feedstock for 2nd generation ethanol production. Other byproducts generated during the pretreatment such as the hydrolyzate of hemicellulose and soluble lignin may be used in the context of an integrated biorefinery.

Key-words: EFB, pretreatment, optimization of enzymatic hydrolysis, 2nd generation ethanol, biorefinery

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DE UMA BIORREFINARIA, COM PRODUÇÃO DE COMBUSTÍVEIS, PRODUTOS QUÍMICOS E ENERGIA, A PARTIR DE DIFERENTES RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS. FONTE: Adaptado de JØRGENSEN, KRISTENSEN E FELBY (2007)	27
FIGURA 2 - ASSOCIAÇÃO ENTRE OS TRÊS PRINCIPAIS COMPONENTES DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS: CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA...	29
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DA CADEIA LINEAR DA CELULOSE, FORMADA POR VÁRIAS UNIDADES CONSECUTIVAS DE CELOBIOSE	30
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DOS MONOSSACARÍDEOS QUE FORMAM A HEMICELULOSE: A - B-D-XILOSE; B - A-L-ARABINOPIRANOSE; C - A-L-ARABINOFURANOSE; D - B-D-GLICOSE; E - B-D-MANOSE; F - B-D-GALACTOSE; G – ÁCIDO-B-D-GLUCURÔNICO; H - ÁCIDO-A-D-4-O-METILGLUCURÔNICO; I - ÁCIDO-A-D-GALACTURÔNICO; J - A-L-RAMNOSE; K - A-L-FRUTOSE	32
FIGURA 5 – ESTRUTURAS DOS ÁLCOOIS PRECURSORES DA LIGNINA: p-CUMARÍLICO, CONIFERÍLICO E SINAPÍLICO	33
FIGURA 6 - DEGRADAÇÃO DA CELULOSE EM GLICOSE: CBH I (CELOBIOHIDROLASE I); CBH II (CELOBIOHIDROLASE II); EG (ENDOGLUCANASES); BG (B-GLICOSIDASE).....	47
FIGURA 7 - ESTRUTURA DOS DOMÍNIOS CATALÍTICOS DE CBH E EG: A - Cel 6A DE <i>Humicola insolens</i> ; B - ENDOGLUCANASE E2 DE <i>Thermobifida fusca</i>	48
FIGURA 8 - PALMA OLEAGINOSA EM DIFERENTES SITUAÇÕES. A PARTIR DO CANTO SUPERIOR DIREITO, NO SENTIDO HORÁRIO: PLANTAÇÃO DE PALMA OLEAGINOSA; CACHOS DE PALMA OLEAGINOSA CONTENDO OS FRUTOS; FRUTOS INTEIROS E REPARTIDOS AO MEIO; CACHOS VAZIOS APÓS EXTRAÇÃO DOS FRUTOS	50
FIGURA 9 - PRODUÇÃO DE ÓLEO DE PALMA ENTRE 2012/2013	50

FIGURA 10 - PLANTAÇÃO DE PALMA OLEAGINOSA NO BRASIL, EM MIL DE HECTARES.....	51
FIGURA 11 - PROCESSAMENTO DA PALMA E PRODUÇÃO DO ÓLEO E BIODIESEL	52
FIGURA 12 - CACHOS VAZIOS DE PALMA (EFB).....	61
FIGURA 13 - FLUXOGRAMA DAS PRINCIPAIS ETAPAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO E ENZIMÁTICO PARA PRODUÇÃO DE HIDROLISADO DE EFB PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO A PARTIR DE EFB.....	63
FIGURA 14 - SHAKER TIPO BANHO-MARIA E A DISPOSIÇÃO DOS ERLLENMEYERS NO INTERIOR.....	72
FIGURA 15 - EQUIPAMENTO UTILIZADO NO ESCALONAMENTO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO EFBt: BANHO MARIA ACOPLADO A UM AGITADOR MECÂNICO E DISPOSIÇÃO DA AMOSTRA NO RECIPIENTE	80
FIGURA 16 - ESTRUTURA SUPERFICIAL DO SUBSTRATO AVICEL NO AUMENTO DE 100X	89
FIGURA 17 - ESTRUTURA SUPERFICIAL DO SUBSTRATO AVICEL NO AUMENTO DE 500X	89
FIGURA 18 - DIFERENÇAS APRESENTADAS NOS EFBs ANTES DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO - A, DEPOIS DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO - B, E APÓS PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO-BÁSICO – C.....	95
FIGURA 19 - COLORAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA OBTIDAS APÓS CADA ETAPA DE LAVAGEM DOS EFBS PRÉ-TRATADOS TERMOQUIMICAMENTE.....	98
FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM CADA AMOSTRA RETIRADA DAS LAVAGENS SUCESSIVAS NAS FIBRAS DE EFB APÓS O TRATAMENTO ALCALINO	99
FIGURA 21 - ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA ENZIMA CELLIC CTEC2 EM AMOSTRAS RETIRADAS DE LAVAGENS SUCESSIVAS DAS FIBRAS DE EFB APÓS O TRATAMENTO ALCALINO	101

FIGURA 22 - RELAÇÃO ENTRE O AUMENTO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA CTEC2 E A DIMINUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM AMOSTRAS DE ÁGUAS DE LAVAGENS SUCESSIVAS DAS FIBRAS DE EFBs APÓS O TRATAMENTO ALCALINO.....	103
FIGURA 23 - GRÁFICO DE PARETO A PARTIR DO PLANEJAMENTO 2 ⁴⁻¹ : PRIMEIRA ETAPA DA OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO AVICEL COM AS ENZIMAS CELLUCLAST 1.5L E NOVOZYMES 188	110
FIGURA 24 - DIAGRAMA DE PARETO OBTIDO A PARTIR DO DCCR PARA A PRODUÇÃO DE GLICOSE - SEGUNDA ETAPA DA OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO AVICEL.....	115
FIGURA 25 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO DCCR PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE OBTIDA APÓS SACARIFICAÇÃO DE AVICEL EM FUNÇÃO: A - DO TEMPO E DA CONCENTRAÇÃO DE CELLUCLAST 1.5L; B - DA CONCENTRAÇÃO DAS DUAS ENZIMAS; C - DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA NOVOZYMES 188 E DO TEMPO	116
FIGURA 26 - GRÁFICO DE PARETO - DCCR PARA A PRODUÇÃO DE GLICOSE DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE AVICEL COM A ENZIMA COMERCIAL CELLI CTEC2.....	121
FIGURA 27 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO DCCR PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE EM FUNÇÃO: A - DA CONCENTRAÇÃO DE AVICEL E DO TEMPO; B - DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA CELLIC CTEC2 E DO TEMPO; C - DAS CONCENTRAÇÕES DE AVICEL E DE CELLIC CTEC2	122
FIGURA 28 - GRÁFICO DE PARETO APRESENTANDO OS EFEITOS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS (p<0,05) A PARTIR DO DCCR PARA A PRODUÇÃO DE GLICOSE DURANTE A SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE EFB _t COM AS ENZIMAS COMERCIAIS CELLUCLAST 1.5L E NOVOZYMES 188.....	128
FIGURA 29 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO DCCR PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE EM FUNÇÃO: A - DA CONCENTRAÇÃO CELLUCLAST E DO TEMPO; B - DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA NOVOZYMES 188 E DO TEMPO; C - DAS CONCENTRAÇÕES CELLUCLAST E NOVOZYMES 188	130

FIGURA 30 - GRÁFICO DE PARETO A PARTIR DO DCCR PARA A PRODUÇÃO DE GLICOSE DURANTE A SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE EFB _t COM A ENZIMA CELLIC CTEC 2	137
FIGURA 31 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO DCCR PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE EM FUNÇÃO: A - DA CONCENTRAÇÃO DE EFB _t E DO TEMPO; B - DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA CELLIC CTEC 2 E DO TEMPO; C - DAS CONCENTRAÇÕES DE EFB _t E DE CELLIC CTEC2.....	138
FIGURA 32 - FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE EFB PRÉ-TRATADO	143
FIGURA 33 – GRÁFICO RELACIONADO A ABSORBÂNCIA (NM) E A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (G/L).....	160
FIGURA 34 - COMPORTAMENTO DA ENZIMA CELLIC CTEC 2	161
FIGURA 35 - COMPORTAMENTO DA ENZIMA CELLUCLAT 1.5L	162

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	28
TABELA 2 - EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTOS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E SUAS LIMITAÇÕES/ FONTE: Adaptado de – MOOD <i>et al.</i> (2013)	37
TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE HIDRÓLISE ÁCIDA E ENZIMÁTICA	43
TABELA 4 - PRINCIPAIS ENZIMAS COMERCIAIS EXISTENTES NO MERCADO ..	48
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EFB.....	53
TABELA 6 - RESUMO DOS PRINCIPAIS ESTUDOS COM PRÉ-TRATAMENTO, SACARIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOETANOL.....	55
TABELA 7 - COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS PRINCIPAIS TIPOS DE FERMENTAÇÃO.....	59
TABELA 8 - ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA PRESENTE EM ÁGUAS DE LAVAGENS	70
TABELA 9 - PROCEDIMENTOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	74
TABELA 10 - NÍVEIS DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO – HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE AVICEL COM AS ENZIMAS CELLUCLAST 1.5L E NOVOZYMES 188 – 1ª ETAPA	76
TABELA 11 - NÍVEIS DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO DCCR - HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE AVICEL COM AS ENZIMAS CELLUCLAST 1.5L E NOVOZYMES 188 – 2ª ETAPA	77
TABELA 12 – NÍVEIS DOS FATORES ESTUDADOS NO DCCR PARA A OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO AVICEL COM A ENZIMA CELLIC CTEC2	77

TABELA 13 - NÍVEIS DOS FATORES ESTUDADOS NO DCCR PARA OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE EFB _t 15% (m/v) COM AS ENZIMAS CELLUCLAST 1.5L E NOVOZYMES 188	78
TABELA 14 – NÍVEIS DOS FATORES ESTUDADOS NO DCCR PARA OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE EFB _t COM A ENZIMA CELLIC CTEC2	79
TABELA 15 - COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EFBs SEM TRATAMENTO PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIÕES.....	86
TABELA 16 - COMPOSIÇÃO DE EFBs APÓS TRATAMENTO ÁCIDO-BÁSICO.....	91
TABELA 17 - ANÁLISE DE REDUÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DE EFB EM CADA ETAPA DO PRÉ-TRATAMENTO.....	92
TABELA 18 - RESUMO DAS ANÁLISES DAS ÁGUAS DE LAVAGENS DO EFB APÓS TRATAMENTO BÁSICO	103
TABELA 19 - ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DAS ENZIMAS COMERCIAIS UTILIZADAS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE EFB.....	104
TABELA 20 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ⁴⁻¹ COM 3 PONTOS CENTRAIS E 4 VARIÁVEIS - PRIMEIRA ETAPA DA OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO AVICEL.....	107
TABELA 21 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE PRODUZIDA APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA UTILIZANDO: CELLUCLAST 1.5L, NOVOZYMES 188 E AVICEL – PRIMEIRA ETAPA	108
TABELA 22 - DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL COM 3 VARIÁVEIS – SEGUNDA ETAPA DE OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO AVICEL	113
TABELA 23 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE PRODUZIDA APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE AVICEL COM DCCR UTILIZANDO AS ENZIMAS COMERCIAIS CELLUCLAST 1.5L E NOVOZYMES 188 – SEGUNDA ETAPA.....	114

TABELA 24 - DCCR COM 3 VARIÁVEIS – OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO AVICEL COM A ENZIMA CELLIC CTEC2	119
TABELA 25 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (G/L) PRODUZIDA APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM DCCR UTILIZANDO: CELLIC CTEC2 E AVICEL.....	120
TABELA 26 – OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO EFB _t COM AS ENZIMAS CELLUCLAST 1.5L E NOVOZYMES 188	125
TABELA 27 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE PRODUZIDA APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM PLANEJAMENTO DCCR UTILIZANDO: CELLUCLAST 1.5L E NOVOZYMES 188 E EFB _t	129
TABELA 28 - DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL COM 3 VARIÁVEIS – OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO EFBT COM A ENZIMA CELLIC CTEC2.....	133
TABELA 29 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (g/L) PRODUZIDA APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM DCCR UTILIZANDO: CELLIC CTEC2 E AVICEL.....	134
TABELA 30 - RESULTADOS DA SACARIFICAÇÃO ANTES DO ESCALONAMENTO, DOS TESTES COM BATELADA ALIMENTADA, E APÓS O ESCALONAMENTO.....	140
TABELA 31 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE ETANOL OBTIDAS APÓS FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE EFB	142
TABELA 32 - TEMPOS DE RETENÇÃO E ÁREAS DE CADA PADRÃO UTILIZADO NA CLAE.....	159

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABRAPALMA - Associação dos Produtores de Óleo de Palma
AFEX- Explosão a vapor com amônia líquida
ANOVA - Análise de Variância
ART - Açúcares Redutores Totais
CBH - Celobiohidrolase
CBM - *Carbohydrate Binding Module*
CBU - Unidade de celobiose, medida utilizada para expressão a atividade celobiásica segundo Ghose, 1987
CD - *Catalytic Domain*
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CME – Centro do Microscopia Eletrônica
CMC - Carboximetilcelulose
DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional
DNS - Ácido 3,5-dinitro-salicílico
DTPA - Diethylenediaminepentaacetic acid
EC - *Enzyme Comission*
EDS – *Energy Dispersion Spectroscopy*
EFB - Empty Fruit Bunch
EFB_t - Empty Fruit Bunch pré-tratado com ácido e base
EG - Endoglucanase
EXG - Exo-glucanase
FDA - Fibra em Detergente Ácido
FDN - Fibra em Detergente Neutro
FPU- Unidades de papel de filtro, unidade de medida utilizada para expressar a atividade celulásica total segundo Ghose, 1987
GJ – Giga - Joules
h – horas
HMF: Hidroximetilfurfural
ICr - Índice de cristalinidade
LPB – Laboratório de Processos Biotecnológicos

MDA – Ministério do Desenvolvimento Agrário

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

min – minutos

PF – Papel Filtro

rpm – Rotações por minuto

SE – Solução estoque

SHF- *Separate Hydrolysis and Fermentation*

Si - Silício

SSF- *Simultaneous Saccharification and Fermentation*

UV - espectrofotometria de absorção no ultravioleta

YMA - *Yeast extract Malt Agar*

YPG -*Yeast Potato Glucose*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 OBJETIVO GERAL	23
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	25
2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAS LIGNOCELULÓSICOS	28
2.2.1 Celulose	29
2.2.2 Hemicelulose	31
2.2.3 Lignina	33
2.4.4 Outros componentes	34
<i>SÍLICA</i>	35
2.3 PRÉ-TRATAMENTOS	35
2.3.1 Pré-Tratamento ácido	38
2.3.2 Tratamento Básico	40
2.3.3 Inibidores enzimáticos	41
2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE	42
2.5 ENZIMAS: ENDOCELULASES, EXOCELULASES E B-GLICOSIDASES	46
2.5.1 Celulases comerciais	48
2.6 PALMA	49
2.6.1 Composição química de EFB	53
2.6.2 Tratamentos químicos e enzimáticos de EFB para a produção de etanol	54

2.7 FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DE ETANOL DE 2ª GERAÇÃO A PARTIR DE RESÍDUOS	57
3 MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1 MATERIAL	61
<i>Substratos</i>	61
3.2 MÉTODOS	62
3.2.1 Preparação da palma.....	64
3.2.2 Caracterização química dos EFBs.....	64
3.2.3 Análise estrutural de EFB por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	65
3.2.4 Análise química elementar de EFB por EDS – <i>Energy Dispersion Spectroscopy</i>	66
3.2.5 Pré-tratamento com ácido diluído dos EFB	66
3.2.6 Pré-tratamento alcalino dos EFB	67
3.2.6.1 Caracterização das águas de lavagem do resíduo EFB após tratamento básico	68
Análise de fenóis totais presentes nas amostras das águas de lavagem	68
<i>Determinação da atividade da enzima Cellic CTec2 na presença das águas de lavagem contendo compostos fenólicos</i>	69
3.2.7 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise de etanol e açúcares	70
3.2.8 Tratamento enzimático dos substratos Avicel e EFB pré-tratado (EFB _t) ...	71
3.2.9 Determinação da atividade enzimática das enzimas comerciais empregadas na hidrólise enzimática de EFB e Avicel	73
3.2.9.1 Atividade celulolítica das enzimas empregadas no tratamento enzimático de EFB e Avicel	73
3.2.9.2 Atividade da enzima β -glicosidase	75

3.2.10 Otimizações das condições do processo de hidrólise enzimática do substrato Avicel	76
3.2.10.1 Otimização da hidrólise enzimática de Avicel com as enzimas comerciais Celluclast 1.5L e Novozymes 188	76
3.2.10.2 Otimização das condições da hidrólise enzimática de Avicel com a enzima comercial Cellic CTec2	77
3.2.11 Estudo da otimização das condições do processo de hidrólise enzimática dos EFB _s	78
3.2.12 Estudo de variação de escala da hidrólise enzimática de EFB _t	79
3.2.13 Comparação do tratamento enzimático do EFB _t com a enzima produzida no LPB	80
3.2.14 Cálculo do rendimento do tratamento enzimático	81
3.2.15 Testes com leveduras alcoogênicas para a produção de etanol de 2 ^a geração a partir do hidrolisado enzimático de EFB _t	82
3.2.15.1 Conservação das cepas	82
3.2.15.2 Condições de crescimento das cepas utilizadas	82
3.2.15.3 Preparo do pré-inóculo de cada levedura utilizada.....	83
3.2.15.4 Produção de etanol em meio sintético.....	83
3.2.16 Produção de etanol com o hidrolisado enzimático de EFB _t	83
3.2.17 Determinação dos parâmetros fermentativos	84
4.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PRÉVIA DOS SUBSTRATOS.....	85
4.1.1 Preparação dos cachos de frutos vazios (<i>Empty Fruit Brunch</i> – EFBs).....	85
4.1.2 Caracterização química e morfológica dos EFBs	86
4.1.2 Caracterização do substrato Avicel.....	89
4.2 PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO-BÁSICO.....	90
4.2.1 Composição do EFB após pré-tratamento ácido-básico.....	90
4.2.2 Análise morfológica do EFB após etapa do pré-tratamento ácido básico..	94

4.3 LAVAGENS SUCESSIVAS DA FIBRA DE EFBs APÓS TRATAMENTO QUÍMICO	98
4.3.2 Determinação da atividade enzimática da enzima Cellic CTec2 na presença das amostras das águas de lavagem.....	100
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS CELULASE E CELOBIASE	104
4.5 OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS DE NATUREZA CELULÓSICA E LIGNOCELULÓSICA.....	105
4.5.1 Estudo da otimização do processo de hidrólise enzimática do substrato Avicel	106
4.5.1.1 Otimização das condições da hidrólise enzimática do substrato Avicel com as enzimas comerciais Celluclast 1.5l e Novozymes 188.....	106
4.5.2 Estudo das otimizações do processo de hidrólise enzimática do substrato palma pré-tratada (EFB _t)	124
4.5.2.1 Otimização da hidrólise enzimática com as enzimas comerciais Celluclast 1.5L, Novozymes 188 para o substrato EFB _t	124
4.5.2.2 DCCR com o substrato EFB _t e a enzima comercial Cellic Ctec2	132
4.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE EFB _t EM TANQUE AGITADO	139
4.7 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO EFB _t E DO AVICEL COM EXTRATO ENZIMÁTICO PRODUZIDO NO LPB	141
4.8 PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE EFBs	142
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	144
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	146
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

APÊNDICE I	159
APÊNDICE II	160
APÊNDICE III	161
APÊNCIDCE IV	163

1 INTRODUÇÃO

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos para a produção de açúcares fermentescíveis tem conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, devido às características operacionais que garantem vantagens em relação aos processos químicos de hidrólise convencionais. Enzimas são biodegradáveis, possuem alta especificidade, o que acarreta em pouca formação de subprodutos e inibidores da fermentação, geram resíduos que não necessitam de tratamentos onerosos, o processo é realizado sob condições brandas de pH e temperatura e, como resultado, altos rendimentos do processo de hidrólise são atingidos.

A hidrólise da fração celulósica de materiais lignocelulósicos é promovida por enzimas celulolíticas. As celulasas, endo e exo-celulasas, são as enzimas protagonistas na degradação da celulose, seguidas das β -glicosidases, que não atacam propriamente a celulose, mas sim um subproduto da reação que é a celobiose. As interações e a sinergia destas enzimas, também são pontos importantes a serem considerados durante a hidrólise enzimática.

Grandes empresas como Novozymes [®], Genecor [®] e Amano Enzyme [®] possuem a liderança no comércio de enzimas celulolíticas e o valor destas enzimas pode ser extremamente significativo na implantação de processos industriais de biorrefinarias. As biorrefinarias realizam o aproveitamento integral e integrado de biomassa para produção de bionergia, combustíveis e demais produtos de alto valor agregado.

O óleo de palma tem crescente aplicação na indústria alimentícia, química e indústrias de biocombustíveis. Através de incentivos do governo brasileiro para o cultivo de palma por pequenos produtores em busca de uma agricultura social e sustentável, a produção de palma vem aumentando (BRASIL. CMADS, 2010). Entretanto, a geração de resíduos, sólidos e líquidos, irá aumentar, mas este aumento também trará a possibilidade de integrar o processamento destes resíduos nas chamadas biorrefinarias.

Visando a criação de um processo integrado, o qual adota o conceito de biorrefinaria, a Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR

desenvolve um projeto em convênio e suporte financeiro da Empresa Vale S.A. para o aproveitamento de resíduos da palma pensando-se em agregar valor aos subprodutos formados durante o seu processamento. O aproveitamento integrado de resíduos sólidos e líquidos da agroindústria da palma no estado do Pará, que representa um problema para o refino do óleo de palma é, portanto, de extrema importância para a redução de problemas ambientais, haja vista os grandes volumes gerados destes.

Os cachos vazios dos frutos de palma oleaginosa (EFB), resíduo gerado após a retirada dos frutos, por se tratarem de um resíduo lignocelulósico, composto por celulose, hemicelulose e lignina, devem passar por operações que separam estas frações, visando a recuperação destes componentes que serão destinados a outras finalidades. A polpa celulósica, separada após pré-tratamentos físicos e químicos, torna-se acessível às enzimas celulolíticas que a degradam em monômeros de glicose. A otimização das condições da hidrólise enzimática é necessária para a redução de custos com as enzimas, diminuição do tempo de reação e melhora do rendimento do processo.

Os baixos rendimentos de hidrólise enzimática podem estar relacionados a fatores tais como a inibição pelo produto final devido ao acúmulo de glicose e celobiose, a desnaturação térmica das enzimas, após longos períodos de agitação mecânica, e também à presença de inibidores provenientes dos pré-tratamentos.

Sendo assim, este trabalho visa otimizar o tratamento enzimático da fração celulósica de resíduos de palma e fermentação do hidrolisado obtido rico em glicose por leveduras alcoogênicas para a produção de bioetanol de 2ª geração.

1.1 OBJETIVO GERAL

Otimização das condições de hidrólise enzimática da celulose presente nos resíduos sólidos da palma, conhecidos como EFB (*Empty Fruit bunches*), após pré-tratamento físico-químico, e fermentação do hidrolisado para produção de bioetanol.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização química e morfológica do resíduo;
- Pré-tratamento físico-químico dos EFBs;
- Tratamentos dos EFBs para remoção de compostos inibidores de atividade enzimática;
- Monitoramento das fibras de EFB através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), durante os tratamentos químicos e enzimáticos;
- Otimização da hidrólise enzimática de EFBs pré-tratados quimicamente e do substrato sintético Avicel com enzimas comerciais, comparação de resultados;
- Aumento de escala da hidrólise enzimática nas condições otimizadas;
- Comparação da hidrólise enzimática dos substratos EFBs pré-tratados e Avicel utilizando extrato enzimático produzido no LPB;
- Produção de bioetanol com leveduras alcoogênicas a partir do hidrolisado obtido no escalonamento da hidrólise enzimática.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Combustíveis derivados do petróleo, um tipo de energia não renovável e de origem fóssil, começaram a surgir no início do século XX e dominaram o mercado de uma forma rápida. Os preços permaneceram baixos por um longo tempo, até a crise do petróleo em 1970. O consumo indiscriminado do petróleo aumentou a liberação de CO₂ na atmosfera, e como consequência, trouxe extensas mudanças climáticas (BUCKERIDGE *et al.*, 2009).

A busca por fontes energéticas sustentáveis e de materiais renováveis surgiu atrelada à demanda energética em diversos setores, principalmente em relação aos transportes, diminuição da emissão de CO₂ na atmosfera por combustíveis fósseis, preservação das reservas energéticas e desenvolvimento da economia rural (ZHANG, 2008). Muitos países preocupados com a questão dos combustíveis e o meio ambiente, iniciaram o investimento em pesquisas em busca de novas fontes renováveis e tecnologias alternativas, visando a substituição do petróleo e seus derivados (RAMOS, 2000).

O etanol pode ser usado como fonte de energia líquida e/ou aditivo de combustível. Uma grande vantagem do etanol, se comparado com os combustíveis fósseis, é que este pode ser produzido por processos biológicos de fermentação com leveduras ou bactérias. A rota clássica de sua produção de etanol com o uso de leveduras é conhecida há milhares de anos e representa um dos mais antigos processos biotecnológicos aplicados pela humanidade. Esta teve início no século XX, principalmente destinada a combustíveis. Porém, com o domínio do petróleo a produção passou a ser, em grande parte, destinada para alimentos e, nos últimos anos, está voltando a ser alvo de pesquisas e investimentos para combustíveis (WILLKE e VORLOP 2004).

A utilização da biomassa lignocelulósica para produção de etanol de segunda geração é vantajosa sobre a produção que usa como base açúcares (etanol de primeira geração) e amido, uma vez que a matéria-prima utilizada não é diretamente

ligada à alimentação, havendo a diminuição da competição com a produção de alimentos (DIAS *et al.*, 2011, ALVIRA *et al.*, 2010; SÁNCHEZ e CARDONA, 2008).

Na maioria dos casos, a produção de etanol é realizada a partir da sacarose presente na cana-de-açúcar no Brasil e milho nos EUA (HOWARD *et al.*, 2003). Como exemplo de matérias primas lignocelulósicas com potencial para a produção de etanol de segunda geração pode-se citar: palha de cereais, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos florestais (SIMS *et al.*, 2010).

A produção comercial de bioetanol no Brasil é exclusivamente de cana-de-açúcar. A plantação de cana-de-açúcar, que é destinada a este fim, ocupa apenas 0,9% das áreas que podem ser cultivadas (excluindo as áreas de proteção ambiental). Para a produção de alimentos 15% da terra cultivável é usada. Assim, o Brasil tem espaço territorial suficiente para elevar significativamente a produção de alimentos e, também, de biocombustíveis. Com o provável aumento da produção de biocombustíveis brasileiros ligados ao uso de biomassa (bagaço de cana e folhas, resíduos de palma e outros) nos próximos anos, não será necessário a demanda de novas áreas agrícolas (SOCCOL *et al.*, 2010).

Tem sido relatado que a utilização do etanol celulósico tem o potencial para reduzir as emissões de gases de efeito estufa em 86% (WANG, MU e HUO, 2007). Com isso a produção de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica torna-se uma importante alternativa para a redução de problemas ambientais.

Biocombustíveis de primeira geração a partir da cana-de-açúcar vão continuar a ser produzidos, uma vez que são essenciais para suprir a demanda de combustíveis destinada ao transporte. A incorporação dos combustíveis de 2ª para juntamente com os de 1ª geração deve acontecer entre as próximas 1-2 décadas. A experiência adquirida a partir da implantação e uso de biocombustíveis de 1ª geração serão transferidas para apoiar e orientar o desenvolvimento de biocombustíveis de 2ª geração. Por se tratar de uma tecnologia nova, políticas específicas vão ser destinadas para a implantação desta com intuito de aumentar o desempenho industrial e a segurança do abastecimento em diferentes países (SIMS *et al.*, 2010).

Tendo em vista a produção do bioetanol combustível a partir da biomassa lignocelulósica a eficiência da conversão deste material a açúcares fermentescíveis é essencial para a viabilidade econômica do bioetanol de 2ª geração.

Existem quatro estágios na produção de etanol de materiais lignocelulósicos: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação (LIMAYEM e RICKE, 2012).

A biomassa é sintetizada através da reação da fotossíntese, que converte a energia solar em energia química, estoca esta energia em forma de carboidratos " $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$ ", e fixa o carbono atmosférico "carbono vivo". A matéria-prima lignocelulósica é mais barata que as demais já utilizadas para produção de combustíveis, como petróleo, semente de milho e óleo de soja, tendo como base o valor em \$/quantidade de energia produzida (Giga Joules-GJ). Como exemplo pode-se citar o preço do óleo cru que varia entre US\$40 a US\$80 por barril (ou seja, \$7,1-14,2/GJ) sendo muito maior do que o preço de lignocelulose (\$ 0-3 /GJ) (ZHANG, 2008).

O conceito de biorrefinaria engloba o uso da biomassa para produção de bionergia, combustíveis e produtos/subprodutos de alto valor agregado, a partir de tecnologias e processos biotecnológicos. Assim, a biorrefinaria torna-se uma indústria integrada, com novas rotas de aproveitamento sendo descobertas e implementadas (FERNANDO *et al.*, 2006). Pode-se citar o uso de materiais lignocelulósicos e a construção de biorrefinarias integradas, como exemplos que seguem um conceito análogo às refinarias de petróleo já existentes (JEFFRIES e JIN, 2000). Além disso, deve-se observar todo o potencial energético e econômico da cadeia produtiva das biorrefinarias, e seus reflexos econômico, social e ambiental. A FIGURA 1 mostra um fluxograma geral de uma biorrefinaria, com exemplos de resíduos que podem ser processados e transformados em combustíveis dentre outros subprodutos.

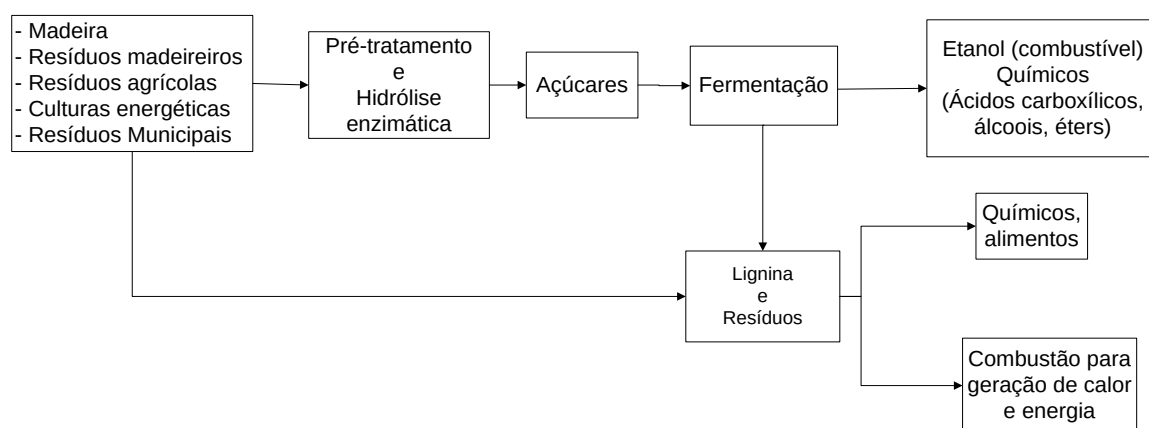


FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DE UMA BIORREFINARIA, COM PRODUÇÃO DE COMBUSTÍVEIS, PRODUTOS QUÍMICOS E ENERGIA, A PARTIR DE DIFERENTES RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS. FONTE: Adaptado de JØRGENSEN, KRISTENSEN E FELBY (2007)

2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAS LIGNOCELULÓSICOS

A composição química dos materiais lignocelulósicos varia em quantidade, mas os principais constituintes são celulose, hemicelulose e lignina, além de outros minoritários (extraíveis, cinzas, proteína).

Na TABELA 1 é possível observar a composição de alguns dos resíduos lignocelulósicos mais estudados para a produção de bioetanol. A composição da lignocelulose é muito variável e depende da espécie do vegetal, idade e condições de crescimento. A distribuição da celulose, hemiceluloses e lignina bem como os conteúdos dos diferentes açúcares da hemicelulose e precursores da lignina variam significativamente entre os diferentes vegetais (JØRGENSEN, KRISTENSEN e FELBY, 2007).

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

RESÍDUO	CELULOSE (%)	HEMICELULOSE (%)	LIGNINA (%)	REFERÊNCIA
Palma EFB	43,8	35,0	16,4	HAMZAH, IDRIS AND SHUAN, 2011
Cana-de-açúcar	37,4	23,7	25,1	FUENTES <i>et al.</i> , 2011
Palha de milho	46,1	18,8	17,3	YI <i>et al.</i> , 2013
Palha de arroz	36,6	16,1	13,0	HSU <i>et al.</i> , 2010
Palha de Trigo	34,8	25,2	17,7	KRISTENSEN <i>et al.</i> , 2007

O componente presente em maior quantidade nos materiais citados é a celulose que apresenta entre 35 e 50%, seguido de hemicelulose 16–35% e lignina 13–25%) valores também encontrados na literatura por (HAMELINCK, HOOIJDONK e FAAIJ, 2005). Uma pequena parte de extrativos e minerais também compõe a estrutura destas biomassas (GÍRIO *et al.*, 2010).

Na FIGURA 2 observa-se como estão dispostos os componentes: celulose, hemicelulose e lignina no material lignocelulósico.

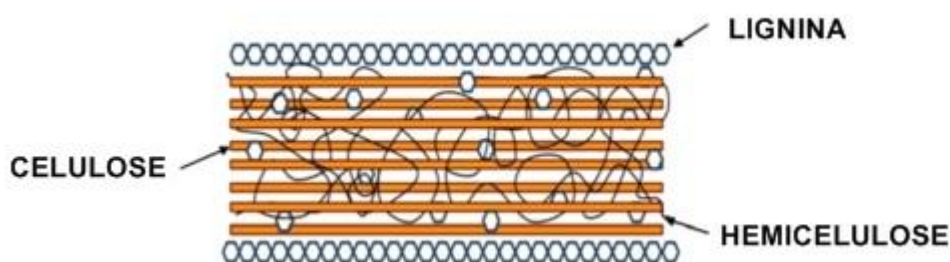


FIGURA 2 - ASSOCIAÇÃO ENTRE OS TRÊS PRINCIPAIS COMPONENTES DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS: CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA
 FONTE: Adaptado de MOOD *et al.* (2013)

O uso de materiais lignocelulósicos como fonte de açúcares para subsequente fermentação por micro-organismos, deve passar por etapas que disponibilizam os açúcares C6 (glicose) e C5 (xilose) para serem metabolizados. Dois terços de matéria seca presentes nas células das paredes, são polissacarídeos que podem ser hidrolisados em açúcares e, em seguida, fermentados a bioetanol. O rendimento do processo em etanol vai depender apenas dos componentes celulose e hemicelulose, uma vez que a lignina não pode ser usada para este fim (BALAT, 2011).

2.2.1 Celulose

A celulose está presente na parede celular dos vegetais, sendo o maior componente da estrutura lignocelulósica. É um homopolímero linear de cadeia longa, de massa molecular variável com fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$ (BALAT, 2011).

A estrutura da celulose forma-se pela união de moléculas de D-glicose, por meio de ligações β -1-4 glicosídicas (FIGURA 3). Quando ocorre a ligação glicosídica de duas unidades de glicose entre os carbonos 1 e 4, ocorre a liberação de água e a formação de uma unidade dissacarídica denominada celobiose (FENGEL e WEGNER, 1989). A celulose possui uma estrutura linear ou fibrosa, na qual se estabelecem múltiplas pontes de hidrogênio entre seus grupos hidroxilas, que

correspondem a ligações intramoleculares, entre moléculas de glicose, e intermoleculares, entre as distintas cadeias justapostas de glicose, originando microfibrilas cristalinas e insolúveis em água. Estas deixam a estrutura com pouca área de superfície de contato (FENGEL e WEGNER, 1989; ZHANG, 2008).

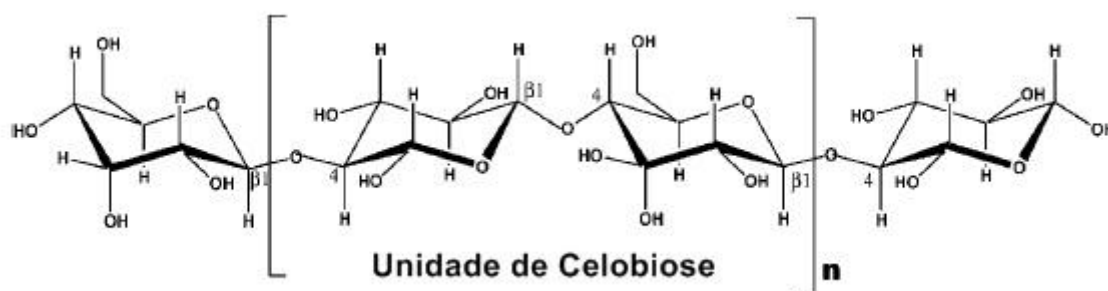


FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DA CADEIA LINEAR DA CELULOSE, FORMADA POR VÁRIAS UNIDADES CONSECUTIVAS DE CELOBIOSE
FONTE: Adaptado de YU, LOW e WU (2008)

A celobiose é definida como a unidade básica de repetição da celulose (formada por duas glicoses anidras) (YU, LOU e WU, 2008), enquanto a glicose representa a unidade fundamental das cadeias do homopolímero (FENGEL e WEGNER, 1989).

As cadeias de celulose na matéria-prima lignocelulósica estão dispostas em microfibrilas com regiões que apresentam estrutura cristalina, bem como áreas menos ordenadas (amorfa ou não cristalina) que apresentam orientação randômica. Um modelo sugere que a parte cristalina da celulose se localiza no interior das microfibrilas, enquanto que a região menos ordenada fica na superfície (HASTRUP *et al.*, 2012; LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005; LARSSON, WICKHOLM E IVERSEN., 1997).

O índice de cristalinidade ou ICr mede a proporção da parte cristalina, e este índice depende da origem da celulose e de como ela é obtida (YU, LOU e WU, 2008). Alguns autores relatam que a celulose amorfa, devido a sua maior área superficial, é mais suscetível à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática do que a forma ordenada ou cristalina (WOOD e SADDLER, 1988). Portanto, um dos objetivos

principais do pré-tratamento é tornar a celulose cristalina, mais suscetível à hidrólise enzimática (TAHERZADEH e KARIMI, 2008).

A celulose pode ser hidrolisada em glicose, por via enzimática, com enzimas celulolíticas ou quimicamente por ácido sulfúrico ou outro em condições de alta pressão e temperatura (ZHENG, PAN e ZHANG, 2009).

2.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose, que representa 20-40% da matéria seca total nos resíduos lignocelulósicos, é um polímero curto, altamente ramificado com pentoses e hexoses.

Diferentes heteropolímeros ramificados de baixa massa molecular, como xilose, arabinose, manose, galactose e glicose, bem como os ácidos urônicos, por meio de ligações glicosídicas do tipo 1-3, 1-4 e 1-6, os quais na maioria das vezes acetilados, compõem a estrutura hemicelulósica. Estes componentes formam ligações fracas e hidrofílicas, gerando uma associação entre a celulose e a lignina, o que resulta na estabilidade e flexibilidade do complexo celulose-hemicelulose-lignina (STAMBUK *et al.*, 2008). Na FIGURA 4 é possível observar algum dos monômeros que compõem a hemicelulose: (β -D-glicose, β -D-manose e β -D-galactose), pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinofuranose e α -L-arabnopirranose), ácidos hexourônicos (ácido α -D-4-O-ácido metilglucurônico, ácido- α -D-galacturônico, ácido- β -D-glucurônico) e desoxi-hexoses (α -L-ramnose, α -L frutose) (GÍRIO *et al.*, 2010).

As hemiceluloses são mais suscetíveis à hidrólise ácida do que a celulose, uma vez que oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais que são usados como catalisadores da reação. Esta característica se deve ao caráter amorfo, que a hemicelulose apresenta em relação à celulose e também ao grau de polimerização que é menor neste caso (BALAT, 2011). A hemicelulose faz ligações covalentes com a lignina e não-covalente com a celulose, este fato pode ser responsável pela integridade da parede celular e também pela proteção contra a degradação enzimática (DING e HIMMEL, 2006; MATTHEWS *et al.*, 2006; UFFEN 1997).

A hemicelulose pode ser hidrolisada por hidrólise enzimática com hemicelulases. No entanto, um pré-tratamento adequado, por exemplo, tratamento com ácido diluído, que hidrolisa a hemicelulose elimina ou reduz a necessidade do uso de hemicelulases (TAHERZADEH e KARIMI, 2008). Os pré-tratamentos com ácido diluído, água ou vapor são as tecnologias mais comumente aplicadas para a hidrólise da hemicelulose, obtendo-se um xarope rico em açúcares (GÍRIO *et al.*, 2010).

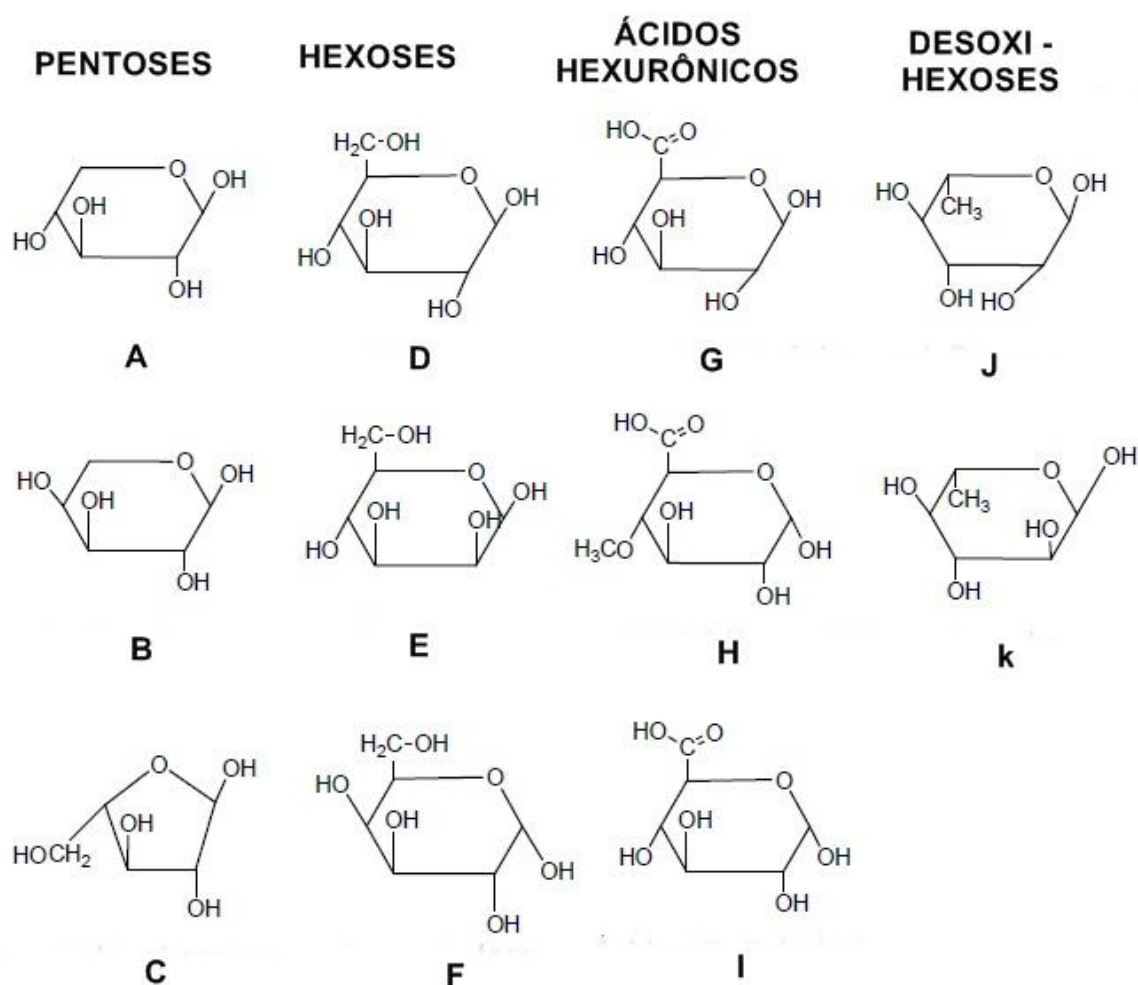


FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DOS MONOSSACARÍDEOS QUE FORMAM A HEMICELULOSE: A - B-D-XILOSE; B - A-L-ARABINOPIRANOSE; C - A-L-ARABINOFURANOSE; D - B-D-GLICOSE; E - B-D-MANOSE; F - B-D-GALACTOSE; G - ÁCIDO-B-D-GLUCURÔNICO; H - ÁCIDO-A-D-4-O-METILGLUCURÔNICO; I - ÁCIDO-A-D-GALACTURÔNICO; J - A-L-RAMNOSE; K - A-L-FRUTOSE

FONTE: Adaptado de FENGEL e WEGENER (1989)

2.2.3 Lignina

A lignina é o elemento de composição não-polissacarídica presente em materiais lignocelulósicos, e que preenche os espaços entre a celulose e a hemicelulose (BERLIN *et al.*, 2005). A lignina é uma macromolécula polifenólica, possui estrutura heterogênea, a qual forma uma rede de anéis aromáticos unidos principalmente por ligações alquil-aryl-éter. Através da FIGURA 5 é possível observar as unidades monoméricas precursoras da lignina que são os álcoois trans-p-cumarílico, trans-coniferílico e álcool trans-sinapílico (FENGEL e WEGENER, 1989; YU, LOU e WU, 2008), derivados do fenilpropano, com diferenças no número de metoxilas ligadas ao anel. Estas unidades formam uma estrutura tridimensional que dificulta a degradação (TAHERZADEH e KARIMI, 2008). Possui um papel biológico importante nos vegetais, reduz a permeabilidade da parede celular, diminuindo a contaminação por patógenos, além de representar uma barreira para a hidrólise enzimática (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). Quanto maior a proporção de lignina no material, maior é sua resistência à degradação química e enzimática (TAHERZADEH e KARIMI, 2008), portanto a retirada deste componente é etapa indispensável do pré-tratamento (MOOD *et al.*, 2013).

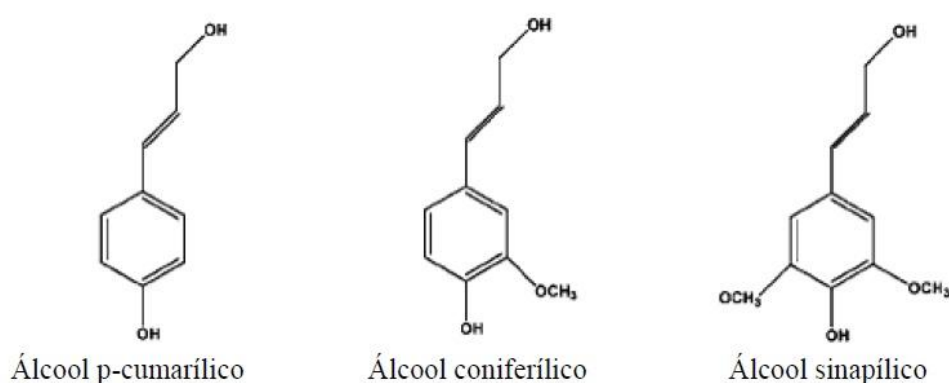


FIGURA 5 – ESTRUTURAS DOS ÁLCOOIS PRECURSORES DA LIGNINA: p-CUMARÍLICO, CONIFERÍLICO E SINAPÍLICO

FONTE: Adaptado de YU, LOU e WU (2008)

Algumas ligações covalentes também são encontradas entre a lignina e os polissacarídeos, reforçando ainda mais a estrutura formada pela lignina e as fibras de celulose (YU, LOU e WU, 2008). A remoção de lignina e hemicelulose provoca grandes mudanças na estrutura da celulose, deixando a celulose mais acessível ao contato com celulasas. Portanto, a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos tem um rendimento baixo, antes da remoção de lignina. A influência da lignina na hidrólise enzimática da celulose não é somente vista como uma barreira que prejudica a ligação da enzima à celulose, há relatos que a sua remoção aumenta a porosidade do substrato e, conseqüentemente, a hidrólise enzimática é favorecida (MANSFIELD, MOONEY e SADLER, 1999).

2.4.4 Outros componentes

O conteúdo inorgânico de uma planta refere-se ao seu teor de cinzas, que é uma medida aproximada dos sais minerais e de outros materiais inorgânicos presentes na fibra após combustão, a uma temperatura de $575 \pm 25^\circ \text{C}$. O material inorgânico pode ser bastante elevado nas plantas que contêm grandes quantidades de sílica (ROWELL, HAN e ROWELL, 2000).

Os extrativos de madeira (lignocelulósicos) compreendem uma grande variedade de substâncias químicas, compostos aromáticos (fenólicos), terpenos, ácidos alifáticos (gorduras/ceras/óleos), álcoois e substâncias inorgânicas, onde a sílica pode ser o principal componente inorgânico. A soma destes componentes varia em cada espécie de material lignocelulósico e representa um baixo percentual do todo, em torno de 5%.

Os extrativos orgânicos presentes na biomassa podem ser extraídos por solventes polares ou apolares. São exemplos de extrativos: ácidos graxos, ceras, alcalóides, proteínas, fenólicos, açúcares simples, pectinas, mucilagens, gomas, resinas, terpenos, amido, glicosídeos, saponinas e óleos essenciais. Os extrativos são compostos intermediários do metabolismo do vegetal; proporcionam reserva energética e proteção ao vegetal contra o ataque de micro-organismos e insetos. Extrativos inorgânicos, tais como, potássio, sódio, cálcio, etc., também estão

presentes e são o resultado dos nutrientes absorvidos durante o seu crescimento (YU, LOU e WU, 2008).

SÍLICA

Corpos de sílica são os minerais mais comuns encontrados na superfície de plantas lenhosas. São formados pela invasão e endurecimento de minerais do solo que se sedimentam nas cavidades do interior da parede celular durante o crescimento das plantas. A morfologia superficial da fibra não tratada serve como uma importante barreira física para a penetração da enzima na superfície e sua acessibilidade à celulose e hemicelulose durante a hidrólise. Por conseguinte, é necessário que seja realizado um pré-tratamento para remover estes corpos de sílica para destruir a superfície recalcitrante da fibra, e assim melhorar a atuação da enzima (HASSAN *et al.*, 2013).

A presença de sílica e de outros metais pode complicar a polpação e o branqueamento de EFB matéria-prima (LAW, DAUD e GHAZALI, 2007).

2.3 PRÉ-TRATAMENTOS

O pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos é uma etapa essencial nos processos de produção de bioetanol, uma vez que a estrutura desse tipo de material é recalcitrante e precisa ser fracionada para que a digestão enzimática ocorra (GRAY, ZHAO e EMPTAGE, 2006). Inicialmente a hidrólise da biomassa é responsável por quebrá-la em polímeros de celulose, hemicelulose e lignina, por meio de processos químicos, físicos ou enzimáticos.

As operações de *upstream* do pré-tratamento incluem principalmente processos físicos (ex: diminuição do tamanho da biomassa) e termoquímicos (LIMAYEM e RICKE, 2012). O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica visa separar a lignina e hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a

porosidade da celulose, assim minimizando a destruição química dos açúcares fermentáveis necessários para a produção de etanol (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Uma grande variedade de tratamentos físicos (hidrólise aquosa, moagem), químicos (ácidos, bases, solventes, ozônio), físico-químicos (explosão à vapor, explosão com amônia-AFEX), e tratamentos biológicos com fungos produtores de celulases e hemicelulases, estão sendo estudados para aumentar a superfície de contato e a acessibilidade das enzimas às fibras de celulose. Na TABELA 2 pode-se observar alguns dos principais pré-tratamentos utilizados, seus efeitos na composição química e estrutural da biomassa, bem como suas limitações.

O tipo de pré-tratamento vai influenciar os tipos de subprodutos e a avaliação da viabilidade do processo, por isso é considerado uma etapa crucial no processo de conversão da biomassa a etanol (SOCCOL *et al.*, 2010). O custo do pré-tratamento é um dos maiores dentro do processo todo, pois é influenciado tanto pelos gastos prévios ao tratamento, ex: diminuição do tamanho das partículas, quanto pela etapa de hidrólise enzimática após o tratamento, ex: custo das enzimas. Um pré-tratamento para ser viável economicamente deve ser de baixo custo, evitar o uso de demasiada quantidade de energia, e a degradação da matéria prima (WYMAN *et al.*, 2005).

A efetividade do pré-tratamento é medida principalmente, pelo teor de lignina que é retirado no processo, quebra da cristalinidade da estrutura da celulose e a não formação de compostos tóxicos. Estes fatores diminuem a eficiência da hidrólise enzimática. O pré-tratamento também influencia fortemente os custos do *downstream*, ao determinar a toxicidade para fermentação, as taxas de hidrólise enzimática, concentração de enzimas a serem empregadas, agitação, concentração e purificação dos produtos finais, geração de possíveis resíduos do processo e o seu tratamento, entre outras variáveis (WYMAN *et al.*, 2005).

Dentre os pré-tratamentos, o tratamento com ácido e base diluídos são os mais utilizados para a preparação do material lignocelulósico. Quimicamente a diferença entre os dois métodos é o de solubilização da fração desejada e formação de inibidores da enzima. No pré-tratamento ácido, a solubilização da fração de hemicelulose é observada enquanto que no pré-tratamento alcalino, o objetivo é a fração de lignina (ADEL *et al.*, 2010).

TABELA 2 - EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTOS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E SUAS LIMITAÇÕES/ FONTE: Adaptado de – MOOD *et al.* (2013)

PRÉ- TRATAMENTO (MÉTODOS)	AUMENTO ESPECÍFICO DA SUPERFÍCIE	DIMINUIÇÃO DA CRISTALINIDADE DA CELULOSE	REMOÇÃO E SOLUBILIZAÇÃO DA HEMICELULOSE	REMOÇÃO DA LIGNINA	FORMAÇÃO DE COMPONENTES INIBIDORES	DESVANTAGENS
Físico	++*	++	-	-	-	Alto consumo de energia
Ácido	++	-	++	+	++	Corrosão dos equipamentos, degradação dos açúcares produzidos, neutralização do resíduo gerado
Alcalino	++	-	+	++	+/-	Longo tempo de tratamento, neutralização do resíduo gerado
Líquido Iônico	++	++	+	+	-	Alto custo com líquido iônico
Organossolve	++	ND	++	++	-	Alto custo de Recuperação e reciclagem dos solventes
Ozonólise	++	ND	-	++	-	Necessidade de grande quantidade de ozônio, processo oneroso
Explosão à vapor	++	-	++	+/-	++	Destruição incompleta de matriz lignina-carboidrato, formação de componentes tóxicos
AFEX	++	++	+	++	+/-	Necessidade de pressão alta, não eficiente para biomassa com grande concentração de lignina, alto custo da amônia
Explosão com CO ₂	++	-	++	-	-	Necessidade de pressão alta, não afeta a lignina e a hemicelulose
Oxidação úmida	++	+	++	++	+/-	Alto custo com oxigênio e catálise
LHW	++	ND	++	+/-	+	Altas temperaturas, necessidade de adicionar um controle de pH alcalino
Biológico	++	+	+/-	++	-	Baixas taxas de hidrólise, ocupa grandes espaços, cuidados com o controle do crescimento dos micro-organismos

*++: ALTO EFEITO; +: EFEITO MODERADO; +/- BAIXO EFEITO; ND: NÃO DETERMINADO

O efeito do pré-tratamento é, portanto, muito dependente da composição da biomassa utilizada e da forma de condução do processo. Cada pré-tratamento possui vantagens e desvantagens que devem ser estudadas visando a otimização do processo. Não somente a avaliação econômica do pré-tratamento deve ser considerada, o estudo do desempenho das enzimas após esta etapa também deve ser avaliada, uma vez que as enzimas vão apresentar comportamentos diferentes frente a cada tipo de tratamento (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). Devido às diferentes características físico-químicas dos materiais lignocelulósicos, cada pré-tratamento é adequado para um tipo de biomassa. Além disso, a escolha do método deve levar em conta: recuperação das pentoses, digestibilidade enzimática, geração de inibidores da fermentação dos carboidratos, tratamento dos resíduos líquidos e baixa demanda de energia nos processos de *downstream* (ALVIRA *et al.*, 2010).

Diversas pesquisas procuram novas tecnologias visando melhorar as condições do pré-tratamento e da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica para uma eficiente conversão a etanol. Dentre estas tecnologias pode-se destacar o baixo custo dos pré-tratamentos, o desenvolvimento de enzimas mais eficientes na hidrólise dos polissacarídeos e a busca por micro-organismos capazes de fermentar diferentes açúcares, pentoses e hexoses, com maior eficiência (GRAY, ZHAO e EMPTAGE, 2006). As pesquisas estão focadas em aprimorar os pré-tratamentos para que eles consigam favorecer a etapa seguinte de hidrólise enzimática da biomassa tratada, utilizando menor dosagem de enzima e curto tempo de conversão (ALVIRA *et al.*, 2010).

2.3.1 Pré-Tratamento ácido

Dentre os pré-tratamentos químicos, hidrólises com ácido diluído são as mais utilizadas (ALVIRA *et al.*, 2010; EL-ZAWAWY *et al.*, 2011 and SILVERSTEIN *et al.*, 2007). O objetivo deste tratamento é solubilizar e hidrolisar a fração de hemicelulose presente na biomassa e tornar a celulose mais acessível às enzimas (MOOD *et al.*, 2013; ZHENG, PAN e ZHANG, 2009). Porém, este mesmo tratamento com ácidos concentrados não são viáveis uma vez que produzem componentes tóxicos durante

o processo, podem danificar equipamentos e aumentar os custos (ALVIRA *et al.*, 2010; SUN e CHENG, 2002).

Processos catalisados com ácido podem ser divididos em duas abordagens gerais, com base na temperatura e concentração: ácidos diluídos/baixas temperaturas, ácido concentrados/altas temperaturas (GÍRIO *et al.*, 2010).

O ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o ácido clorídrico (HCl) são os mais utilizados nas hidrólises de resíduos lignocelulósicos embora outros ácidos minerais tais como ácidos nítrico e trifluoroacético (TFA) também tenham sido relatados (LIMAYEM e RICKE, 2012; SÁNCHEZ e CARDONA, 2008; GÍRIO *et al.*, 2010). Economicamente o HCl é mais viável, pois custa aproximadamente a metade do preço do H_2SO_4 .

Ácidos fracos gerados durante a explosão a vapor são o ácido acético, que é formado por grupos acéticos, presentes na fração hemicelulósica, e ácido fómico e levurônico, derivados da degradação de furfural e HMF (ALVIRA *et al.*, 2010; GÁMEZ *et al.*, 2006). Uma grande variedade de compostos fenólicos também é gerada devido à degradação da lignina, o que depende da característica do material usado (ALVIRA *et al.*, 2010). Esses compostos afetam o metabolismo dos micro-organismos no processo de fermentação (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008). Os derivados de furano, furfural e HMF variam de acordo com o tipo de pré-tratamento ácido e o tipo de material utilizado. O furfural é encontrado em menor quantidade que o HMF, mas é considerado um fator inibitório para o crescimento microbiano em torno de 1g/L (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Gámez e colaboradores (2006) relataram em seus estudos com bagaço de cana-de-açúcar que para obter soluções de açúcar (xilose), devem ser utilizados tratamentos que solubilizam os açúcares da fração hemicelulósica deixando as outras frações, celulose e lignina, praticamente intactas. Como exemplo os autores citam que o tratamento com ácidos diluídos (sulfúrico, clorídrico ou de ácido acético são habituais, tipicamente 1-10% (m/v) consiste na hidrólise da fração hemicelulósica, utilizando uma temperatura moderada (intervalo de 100-150°C). Assim, este tipo de tratamento não prejudica a fração celulósica do material. Como resultado da hidrólise ácida espera-se encontrar a fase líquida constituída por açúcares (xilose, glicose e arabinose) e outros produtos de decomposição das hemiceluloses (como oligômeros dos polímeros e ácido acético, gerados a partir da hidrólise de grupos acetila ligados a açúcares) e/ou a decomposição os

monossacarídeos (tais como o furfural, produto de desidratação de pentoses e HMF, produto de desidratação de hexoses).

2.3.2 Tratamento Básico

Igualmente a hemicelulose, a lignina também representa uma barreira física para a hidrólise enzimática (TAHERZADEH e KARIMI, 2008). Entretanto ela não é removida com o tratamento ácido, sendo necessário o tratamento alcalino. A remoção da lignina presente na biomassa usualmente é dada pelo tratamento da mesma com bases, como o hidróxido de sódio, potássio e amônio (GÍRIO *et al.*, 2010).

Tratamentos alcalinos utilizam valores baixos de pressão e temperatura se comparado com outras tecnologias de pré-tratamentos. Pode também ser processado em condições ambientes, porém é exigindo um longo período (horas ou dias ao invés de minutos ou segundos). A aplicação de soluções alcalinas remove grande parte da lignina, por meio do rompimento das ligações estruturais, melhorando a reatividade dos polissacarídeos remanescentes (MOSIER *et al.*, 2005).

Pan e colaboradores (2005) sugeriram que a presença da lignina reduz a hidrólise enzimática da celulose através de dois mecanismos distintos: formação de uma barreira física, que impede a enzima de aderir à celulose, e também que ela não faz ligações com as enzimas. Entretanto, quando há menos lignina na biomassa as enzimas conseguem realizar um hidrólise eficaz e rápida. A este fato se deve a importância do pré-tratamento que remova a parte da lignina da célula vegetal.

Os pré- tratamentos da biomassa lignocelulósica com NaOH diluídos causam inchaço, aumentando a área de superfície interna e diminuição da cristalinidade, quebra das ligações estruturais (pontes de hidrogênio) que ligam a lignina e os carboidratos, e modificação da estrutura de lignina (BALAT, 2011). O tratamento alcalino não hidrolisa a hemicelulose tão efetivamente quanto pré-tratamentos que utilizam ácidos, porém, é efetivo na remoção de lignina, o que traz um aumento na digestibilidade enzimática do material. Além disso, a remoção da lignina causa

modificações na fibra, que faz com que a porosidade aumente, e consequentemente a hidrólise enzimática também (MOOD *et al.*, 2013; MANSFIELD, MOONEY e SADLER, 1999).

Em geral, pouca lignina é solubilizada, mas estudos em palha de milho sugerem que ela é apenas rompida e isso é suficiente para que a digestibilidade celulósica aumente (YANG e WYMAN, 2004).

Han e colaboradores (2012) mostraram que a moagem da palha do trigo, seguida de tratamento com 1,0% de NaOH durante 1,5 h aumentou o teor de celulose em 44,5%, enquanto diminuiu o teor de hemicelulose e lignina, em 44,2% e 42,5%, respectivamente. O tratamento foi eficiente para provocar mudanças na estrutura do material facilitando a hidrólise enzimática. No trabalho de (ZHANG *et al.*, 2010) o método de pré-tratamento alcalino também foi capaz de aumentar a digestibilidade enzimática da biomassa de *Typha latifolia*. Quase 78% da celulose, a partir de matéria prima crua, foi convertida em glicose fermentescível após 48 h, usando uma carga de celulase FPU 60 por g de glucana, e cerca de 25,5, 37,4, 38,4, 42,4 e 55,9% da lignina foi removida com o pré-tratamento usando 0,5, 1, 2, 3 e 4% de NaOH, respectivamente. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 24858) foi usada para fermentar os açúcares liberados pela celulose presente nesta biomassa.

2.3.3 Inibidores enzimáticos

A hidrólise química da hemicelulose pode liberar açúcares como a xilose e outras pentoses, além do furfural, enquanto que o 5-hidroximetilfurfural é proveniente da degradação das hexoses. Estes compostos químicos furfural e HMF são conhecidos por apresentar alta toxicidade para o crescimento e fermentação por micro-organismos produtores de etanol (SAKAI *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos são gerados devido à degradação da lignina. A quantidade e o tipo de compostos fenólicos dependem da fonte de biomassa, uma vez que a lignina em diferentes matérias-primas têm diferentes graus de metoxilação, e associação com os demais compostos, hemicelulose e celulose, na parede celular das plantas (ALMEIDA *et al.*, 2007). Os fenólicos são conhecidos

como os principais inibidores da produção de enzimas por micro-organismos bem como da atividade destas (XIMENES *et al.*, 2010).

No trabalho de Kim e colaboradores (2011) os compostos fenólicos gerados após tratamento da madeira com LHW (*Liquid Hot Water*) foram recuperados e adicionados à celulose (Solka-Floc) para testar o efeito da inibição enzimática durante a sacarificação. Apesar de estarem presentes em baixas concentrações (5 mg/ml) foram significativamente inibidores da celulase, além de terem provocado a precipitação e inativação das β -glicosidases, e redução tanto da taxa quanto dos rendimentos de hidrólise da celulose. Portanto, a diminuição dos efeitos de compostos fenólicos é uma condição necessária para o bioprocessamento de produção de etanol a partir da celulose.

2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE

No desenvolvimento científico para a viabilização do etanol celulósico, ainda existem desafios técnicos e econômicos a serem superados antes da concretização de investimentos em escala comercial, principalmente a redução dos custos relativos às enzimas celulolíticas. A hidrólise enzimática, ou sacarificação, dos açúcares presentes na polpa celulósica, após separação dos demais componentes, hemicelulose e lignina, é fundamental para a produção de bioetanol. Nesta etapa, a celulose, uma hexose, é convertida em açúcares solúveis simples, glicose, e que subsequente são fermentados a etanol.

O pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos é responsável por aumentar a digestibilidade da celulose que vai passar pelo processo de hidrólise enzimática, portanto, a otimização dos dois processos em conjunto é importante no rendimento final da hidrólise enzimática (JØRGENSEN, KRISTENSEN e FELBY, 2007).

A sacarificação dos carboidratos pode ser realizada via enzimática ou com o uso de ácido. Em comparação com a hidrólise ácida, a hidrólise enzimática requer menos energia, em condições ambientais amenas, sendo que estas condições giram em torno de 45-50°C e pH 4-5, além de apresentar um custo efetivo menor

(SARKAR *et al.*, 2012; BALAT, 2011; CANILHA *et al.*, 2012). Na TABELA 3 estão apresentadas algumas comparações entre a hidrólise ácida e enzimática.

TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE HIDRÓLISE ÁCIDA E ENZIMÁTICA

PARÂMETRO	HIDRÓLISE ÁCIDA	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA
Taxa de hidrólise	Rápida (min.)	Lenta (h)
Temperatura	Alta (200°C)	Baixa (45°C)
Pressão	Alta	Atmosférica
Rendimento	Depende do material e dos detalhes do processo	Depende do material e dos detalhes do processo
Formação de subprodutos	Provável formação	Não há formação

FONTE: Adaptado de KRISHNA *et al.* (2000)

As celulasas são peça chave na produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos agroindustriais (OLIVEIRA *et al.*, 2013). A hidrólise enzimática não é um processo bioquimicamente simples, pois a reação envolve um substrato insolúvel (lignocelulose), altamente complexo, e um sistema enzimático solúvel (endo/exocelulasas e β -glicosidasas) que possui enzimas com propriedades catalíticas distintas, embora relacionadas. Portanto, vários fatores têm sido relacionados como limitantes à hidrólise, e podem ser divididos em dois grandes grupos: os associados às mudanças na estrutura do substrato, e os relativos ao comportamento das enzimas durante o processo hidrolítico (RAMOS, 2000).

Como dito na seção 2.2.1, a celulose possui regiões cristalinas e amorfas. A cristalinidade é determinada pelas quantidades relativas de ambas as regiões, sendo que a região cristalina está presente em dois terços do total da celulose. Em alguns estudos onde cristalinidade era considerada importante, os materiais lignocelulósicos foram pré-tratados mecanicamente, por conseguinte, qualquer redução na cristalinidade foi acompanhada por uma alteração de outras características do substrato tais como redução do tamanho de partícula ou o aumento da área de superfície disponível (ALVIRA *et al.*, 2010). As taxas de hidrólise da celulose mediadas por celulasas fúngicas são cerca de 3-30 vezes mais rápidas para a celulose amorfa em comparação com a celulose altamente cristalina (ZHANG e LYND, 2004).

Além da cristalinidade, a hidrólise enzimática leva em conta o grau de polimerização, a acessibilidade, tamanho de partícula, preparação e propriedades dos substratos e o tipo de pré-tratamento que o material lignocelulósico passou previamente (ZHANG e LYND, 2004; ALVIRA *et al.*, 2010).

O grau de polimerização (GP) de substratos celulósicos determina a quantidade de ligações glicosídicas terminais e interiores, e de “substrato” para ação de endo e exo- enzimas (ZHANG e LYND, 2004). Todos os processos que envolvem o isolamento e utilização da celulose para fins industriais geram uma diminuição no seu GP. A solubilidade da celulose reduz drasticamente com o aumento do grau de polimerização devido à presença de pontes de hidrogênio intermoleculares na estrutura de celulose. A mudança do GP durante a hidrólise enzimática é determinada pela relativa proporção das atividades de exo e endo-glucanases e das propriedades da celulose. Exo-glucanases atuam nas extremidades da cadeia, ocorrendo então apenas uma pequena redução do GP, enquanto que as endoglucanases hidrolisam preferencialmente as ligações internas no polímero, causando uma redução drástica do mesmo. A despolimerização depende da natureza do substrato celulósico (ZHANG e LYND, 2004; ALVIRA *et al.*, 2010).

Os baixos rendimentos de hidrólise enzimática podem estar relacionados a fatores como a inibição pelo produto final devido ao acúmulo de glicose e celobiose, a desnaturação térmica das enzimas após longos períodos de agitação mecânica, e também pela adsorção irreversível de enzimas com a lignina, e/ou com o complexo lignina-carboidrato (AGUIAR *et al.*, 2013). Algumas condições operacionais como tipo de substrato, temperatura, pH, também afetam o processo (BALAT, 2011). Por outro lado, a remoção da lignina e da hemicelulose, redução da cristalinidade da celulose, o aumento da porosidade do substrato também podem aumentar significativamente a hidrólise enzimática (SUN e CHENG, 2002; MOOD, 2013).

A relação entre a concentração de substrato e a carga enzimática também afeta a produtividade e a taxa inicial de hidrólise enzimática. Segundo SUN e CHENG (2002), a alta concentração de substrato no meio de reação dificulta os fenômenos de transferência de massas, como também aumenta a concentração dos produtos de hidrólise no meio (celobiose e glicose), diminuindo a eficiência do processo de sacarificação. Entretanto, metodologias para diminuir estes problemas, incluem o uso de concentrações mais elevadas de enzimas, a suplementação com β -glucosidases e a remoção de açúcares durante a hidrólise enzimática. A utilização

dos açúcares durante a sacarificação pode ser realizada por sacarificação e fermentação simultâneas (*SSF*) ou por ultrafiltração, quando a sacarificação e a fermentação são realizadas em separado (*SHF*) (SUN e CHENG, 2002).

O processo enzimático consiste em três etapas: (1) inicialmente ocorre a adsorção das enzimas, celulasas que estão na fase líquida vão para a superfície de celulose (sólida), (2) a biodegradação da celulose em açúcares simples, principalmente glicose, celobiose e oligômeros, e (3) a desorção de celulase para a fase líquida. Assim, a hidrólise é uma reação catalítica heterogênea de contato físico direto entre as moléculas de celulose e das enzimas celulolíticas. Portanto, a área de superfície acessível do material lignocelulósico e a sua interação com as enzimas podem ser um fator limitante na hidrólise enzimática (TAHERZADEH e KARIMI, 2008).

Santos e colaboradores (2011) fizeram um estudo para correlacionar a eficiência da hidrólise enzimática da celulose obtida do bagaço de cana pré-tratado com H_2SO_4 diluído, usando duas preparações comerciais, denominadas celulase I e II, cedidas pelas empresas Genecor e Novozymes. Para as duas hidrólises enzimáticas, planejamentos fatoriais completos foram empregados para avaliar os efeitos causados pelas variáveis independentes: teor inicial de sólidos (1,2-4,8%, m/m), concentração de enzimas (2-38 FPU/g de bagaço), e Tween 20 (0,0-0,1 g/g de bagaço), na resposta de digestibilidade celulose. Os resultados mostraram que as duas preparações enzimáticas continham endoglucanases, celobiohidrolases, Celobiase, β -Glucosidases e Xilanase. Após 24 horas de hidrólise enzimática, todas as variáveis independentes foram significativas na hidrólise da celulose pela preparação enzimática celulase I. Usando a preparação enzimática celulase II, apenas as concentrações de enzima e de surfactante e mostraram efeitos significativos na conversão de celulose. Um experimento adicional mostrou que aumentando o teor de sólidos iniciais de 4,8% (m/m) para 12% (m/m), não comprometeu a eficiência de conversão de celulose, consequentemente, melhorando a concentração de glicose no hidrolisado .

No trabalho de Giese e colaboradores (2013), o tratamento ácido-básico consecutivo em bagaço de cana pode aumentar a efetividade da atividade das enzimas celulasas na degradação da celulose produzindo significativas quantidades de açúcares redutores, 0,9 g de açúcares redutores por g de bagaço de cana pré-tratadas. O delineamento experimental facilitou o estudo de condições favoráveis

para a hidrólise do bagaço, em tempos mais curtos, diminuindo as concentrações das enzimas. As condições dos tratamentos termo-químicos foram: 100 mg de H_2SO_4 por grama de bagaço em um reator de 50 L por 20 min com temperatura de 121°C. O bagaço foi lavado e seco para o tratamento seguinte com 1% (m/v) de NaOH, reator de 50 L por 1 h, com temperatura de 100°C. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou a morfologia indicando o rompimento estrutural do bagaço de cana, após pré-tratamento ácido-base, seguido de hidrólise enzimática.

2.5 ENZIMAS: ENDOCELULASES, EXOCELULASES E B-GLICOSIDASES

Enzimas lignocelulolíticas têm importantes aplicações em vários setores incluindo produtos químicos, combustível, alimentação humana e animal, cerveja e vinho, indústria têxtil e de lavanderia, papel e celulose e agricultura. Muitos estudos estão sendo realizados com objetivo de reduzir o custo das enzimas, entre eles pode-se destacar: *screening* de micro-organismos produtores de novas enzimas, melhoramento genético das cepas industriais existentes com engenharia enzimática, modelos de produção e operação de fatores relacionados, como escolha de substrato, condições de cultura, reciclagem de enzimas e remodelagem de processos (HOWARD *et al.* 2003).

Apesar da celulose ser um polissacarídeo composto somente por um tipo de açúcar que é a glicose, os fungos que a degradam produzem sistemas enzimáticos complexos. O fungo *Trichoderma reesei*, o micro-organismo mais estudado para produção de celulasas, produz duas celobiohidrolases, cinco endoglucanases e duas β -glicosidases já caracterizadas. (JØRGENSEN, KRISTENSEN e FELBY, 2007).

Pelo menos três grupos de celulasas estão envolvidas no processo de hidrólise da celulose: endoglucanase (EG; endo 1,4- β -D-glucanases ou endo -1,4-glucanohidrolase; EC 3.2.1.3) ataca randomicamente as regiões de baixa cristalinidade da fibra de celulose, gerando extremidades livres (redutoras e não redutoras) e diminui o grau de polimerização; exoglucanase ou celobiohidrolase (CBH I e II; 1,4- β -glucano-celobiohidrolase ou exo- 1,4- β -D-glucanase; EC 3.2.1.91),

que degrada a molécula por remoção das unidades de celobiose e/ou glicose das extremidades livres – redutoras CBH I e não redutoras CBH II -, e o terceiro grupo de enzimas que trabalham em conjunto e em sinergia com a CBH e EG, são β -glicosidases (BG–EC 3.2.1.21) que hidrolisam a celobiose (celobioses) para produzir glicose, reduzindo assim o efeito inibidor da celobiose sobre as endo/exo celulases (BALAT, 2011; SÁNCHEZ, 2009; SARKAR *et al.*, 2012; SUN e CHENG, 2002; CANILHA *et al.*, 2012). A atuação destas enzimas pode ser vista na FIGURA 6.

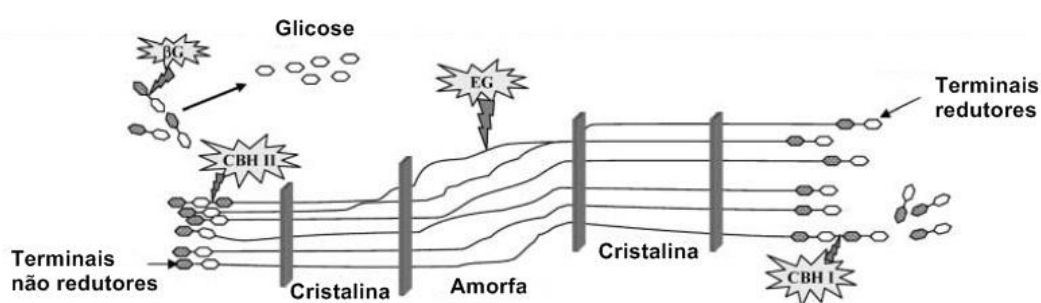


FIGURA 6 - DEGRADAÇÃO DA CELULOSE EM GLICOSE: CBH I (CELOBIOHIDROLASE I); CBH II (CELOBIOHIDROLASE II); EG (ENDOGLUCANASES); BG (B-GLICOSIDASE)
 FONTE: Adaptado de PÉREZ *et al.* (2002)

Endo-glucanases são responsáveis pela catálise da hidrólise das ligações β -1,4, muitas vezes chamadas de carboximetilcelulases (devido ao substrato utilizado para a determinação da sua atividade-CMC). São conhecidas por iniciar o ataque aleatório nos sítios internos das regiões amorfas da fibra de celulose abrindo caminhos para o posterior ataque das celobiohidrolases (SÁNCHEZ, 2009).

Como mencionado anteriormente, existem dois tipos de celobiohidrolases ou exoglucanases, sendo que a CBH I representa 60% das celulases secretadas por *Trichoderma reesei* e a CBH II representa 20% da secreção enzimática de *T. reesei* (AGUIAR *et al.*, 2013).

Pode ser observado na FIGURA 7 que a enzima EG tem um sítio ativo em formato de fenda aberta, o que permite a sua ligação em qualquer local ao longo da cadeia de polímero de celulose, mas mostra ser mais eficaz nas regiões amorfas, enquanto que o sítio catalítico de ExG está dentro de um túnel (HILDÉN e JOHANSSON, 2004; SILVEIRA *et al.*, 2012).

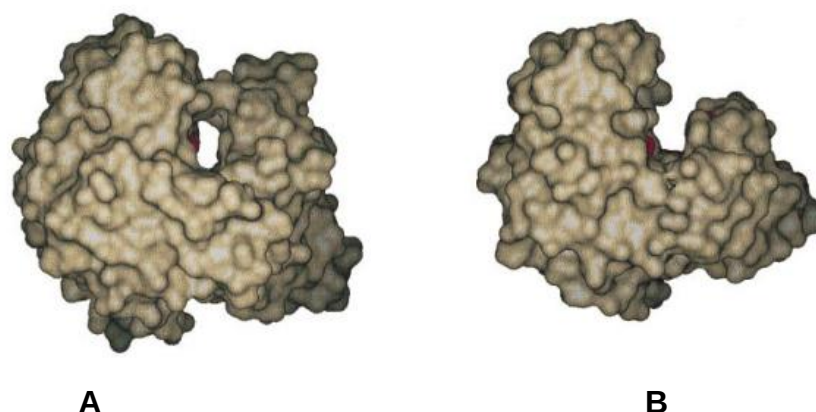


FIGURA 7 - ESTRUTURA DOS DOMÍNIOS CATALÍTICOS DE CBH E EG: A - Cel 6A DE *Humicola insolens*; B - ENDOGLUCANASE E2 DE *Thermobifida fusca*
 FONTE: Adaptado de VARROT *et al.* (1999)

2.5.1 Celulases comerciais

Preparações enzimáticas, compostas pelo sistema enzimático celulolítico, têm sido muito estudadas e estão disponíveis no mercado. Alguns exemplos podem ser vistos na TABELA 4.

As pesquisas nesta área intensificam-se cada dia mais e tem como objetivo melhorar a produção e a qualidade de preparações celulolíticas comerciais, seja pela seleção de melhores cepas, pelo aperfeiçoamento de linhagens comerciais por engenharia genética, ou pelo desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes.

TABELA 4 - PRINCIPAIS ENZIMAS COMERCIAIS EXISTENTES NO MERCADO

ENZIMA COMERCIAL	ORIGEM E CARACTERÍSTICAS	FABRICANTE
Celluclast 1.5L	Celulase; <i>Trichoderma reesei</i> ATCC 26921	Novozymes ®
Novozyme 188	Celobiase de <i>Aspergillus niger</i>	Novozymes ®
Cellic CTec2	Preparação enzimática para a degradação da celulose; origem não informada	Novozymes ®
Cellulase AP3	Celulase; <i>Aspergillus Níger</i>	AmanoEnzyme Inc.
Accellerase Trio	Endo e exo-glucanase, e β - glicosidase; <i>Trichoderma</i> <i>reesei</i> modificado geneticamente	Genencor ®

A descrição do fabricante diz que a Cellic Ctec2 é um complexo de celulases para degradação da celulose em açúcares fermentescíveis; é um *blend* de celulases agressivas, altos níveis de β -glicosidases e hemicelulases. Como características a enzima apresenta: altos níveis de rendimento de conversão, é efetiva mesmo com altas concentrações de substrato, tolerante a inibidores, é compatível com diversas matérias primas, é muito concentrada e estável. Algumas vantagens como menor dosagem de enzima, maior produção e viabilização do etanol também são citadas (Cellic CTec2 – NOVOZYMES, 2010).

Celluclast 1,5L é uma preparação líquida de celulases produzidas por *Trichoderma reesei* que hidrolisa ligações (1,4)- β -D-glucosídicas da celulose. O fabricante recomenda o uso desta enzima junto com a Novozym® 188, uma celobiase.

2.6 PALMA

A palma oleaginosa (*Elaeis guineensis* Jacq.) pertence à família Arecaceae e é originária da África Ocidental. Também conhecida no Brasil como dendê, é uma planta perene, uma espécie tropical que cresce principalmente no clima quente e úmido, com abundância de chuvas. A região Norte do Brasil apresenta as condições ideais para o crescimento de palma de óleo, sendo o estado do Pará um dos maiores produtores (AUGUSTO *et al.*, 2011). Na FIGURA 8 pode-se conhecer a estrutura da palmeira, os cachos contendo os frutos, a anatomia dos frutos onde é extraído o óleo e um resíduo gerado, que são os cachos vazios após a extração.

A palma é cultivada em mais de 15 milhões de hectares ao redor do mundo. Dentre os países mais produtores estão a Indonésia que produziu 90 milhões de toneladas de fruto de palma em 2010 (ISROI *et al.*, 2012), e a Malásia com 79,3 milhões de toneladas em 2006 (TABI *et al.*, 2008), gerando respectivamente, 20,7 e 17, 4 milhões de toneladas de resíduos do tipo EFB - *empty fruit bunch* .



FIGURA 8 - PALMA OLEAGINOSA EM DIFERENTES SITUAÇÕES. A PARTIR DO CANTO SUPERIOR DIREITO, NO SENTIDO HORÁRIO: PLANTAÇÃO DE PALMA OLEAGINOSA; CACHOS DE PALMA OLEAGINOSA CONTENDO OS FRUTOS; FRUTOS INTEIROS E REPARTIDOS AO MEIO; CACHOS VAZIOS APÓS EXTRAÇÃO DOS FRUTOS
 FONTE (SENTIDO HOÁRIO): TORRES E MORALES, 2014A; ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS (2014); TORRES E MORALES, 2014B; DO AUTOR (2014)

A produção mundial em toneladas de óleo de palma entre 2012/2013 está no gráfico a seguir, onde o Brasil representa 5% do total da produção. Na FIGURA 9 é possível observar o gráfico elaborado pelo Sr. Eduardo Ieda, Presidente da Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Palma de Óleo e Vice Presidente ABRAPALMA, para apresentação no 9º *Biodiesel Congress* (Junho/2013), que gentilmente cedeu os dados para esta pesquisa.

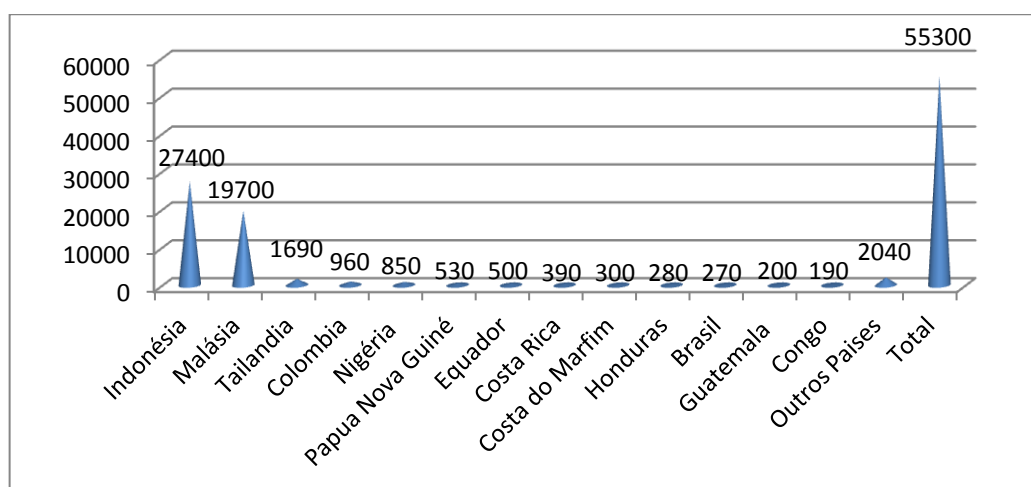


FIGURA 9 - PRODUÇÃO DE ÓLEO DE PALMA ENTRE 2012/2013
 FONTE: BRASIL. ABRAPALMA (2013)

Dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, publicados no Anuário Estatístico da Agroenergia – 2012, último relatório até o momento, mostram que a área em hectares de palma oleaginosa plantada no Brasil cresceu consideravelmente nos últimos anos. No começo da contagem, em 1961, a área plantada correspondia a 2 mil hectares, enquanto a partir do ano de 2010, foi de 112,5 mil hectares. No ano de 2010, foram colhidos 1130 mil toneladas de cachos, o que representa uma produção de 16 toneladas de cachos por hectare plantado, e uma produtividade de 248,6 mil toneladas de óleo (FIGURA 10).

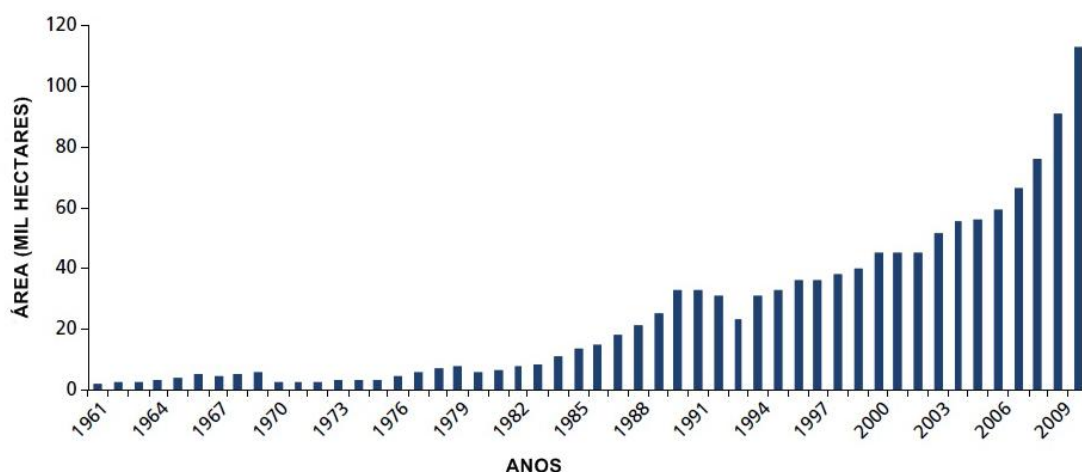


FIGURA 10 - PLANTAÇÃO DE PALMA OLEAGINOSA NO BRASIL, EM MIL DE HECTARES
 FONTE: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2013)

Os cachos vazios (EFBs) são gerados após a extração dos frutos que contêm óleo, representando, portanto, um resíduo com baixo valor comercial e como é gerado em grandes quantidades acaba sendo um problema para as indústrias de processamento da palma. Os EFBs representam 22-23% dos cachos utilizados pela indústria. Convencionalmente, o EFB é queimado, deposto em aterros sanitários, ou usado em compostagem para adubo orgânico. A fim de impedir a poluição do ar e outros problemas ambientais, a queima de EFB não é recomendada. Portanto, novas metodologias para o uso sustentável desta biomassa lignocelulósica, incluindo a bioconversão em produto com valor agregado é muito importante para solucionar estes problemas (ISROI *et al.*, 2012; ALAM *et al.*, 2009).

Atualmente, subprodutos de óleo de palma ainda não possuem um destino eficiente, e a expansão explosiva de plantação da palma gerou uma enorme

quantidade de resíduos vegetais, e problemas ambientais de acúmulo de resíduos. Durante os últimos anos a Malásia sozinha produziu cerca de 30 milhões de toneladas anuais de biomassa de óleo de palma, incluindo troncos, folhagens e cachos de frutos vazios (ABDUL KHALIL *et al.*, 2008).

Na FIGURA 11 está apresentado o fluxograma do processamento da palma e geração de resíduos, destacando a etapa onde são gerados os EFBs.

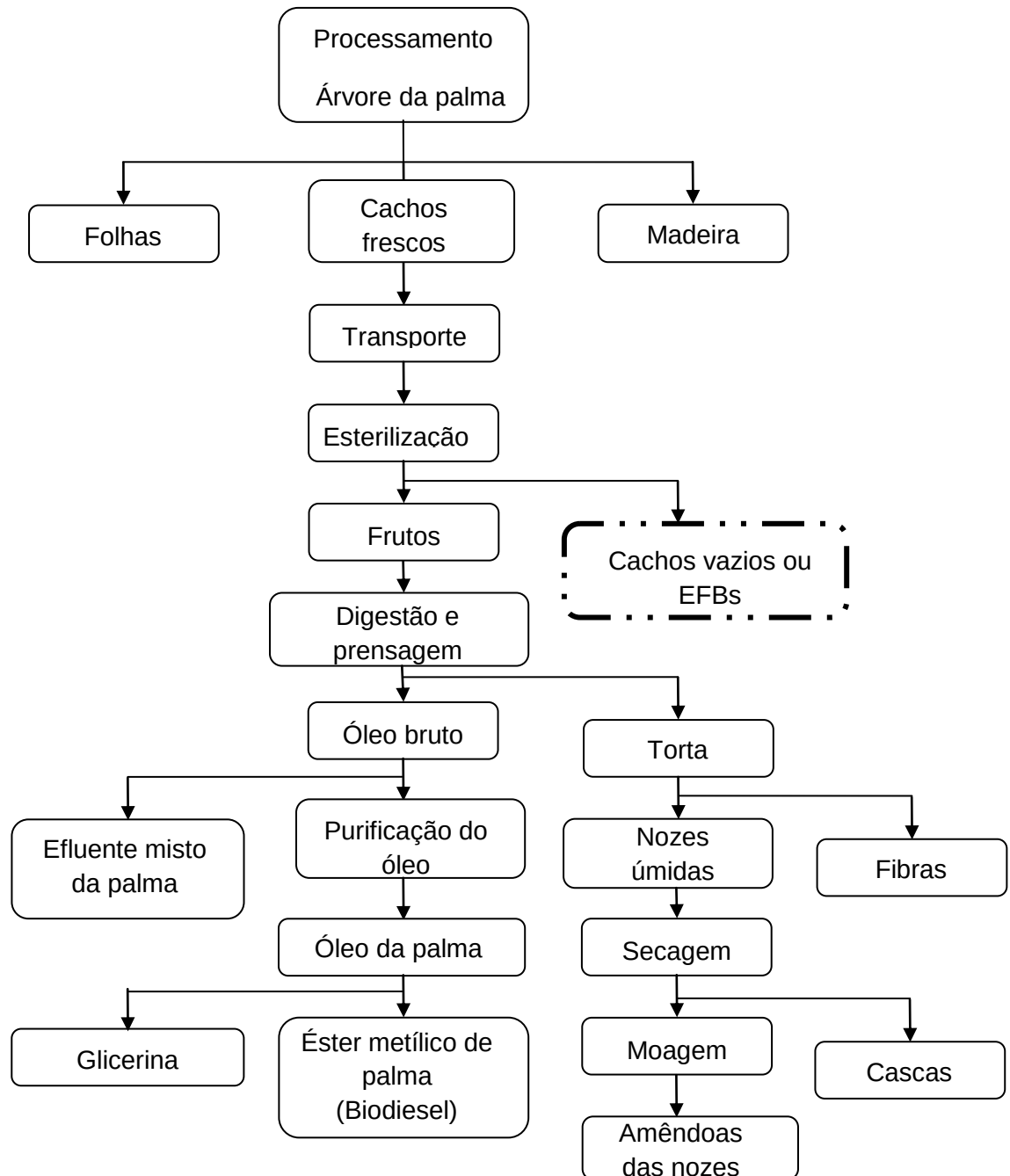


FIGURA 11 - PROCESSAMENTO DA PALMA E PRODUÇÃO DO ÓLEO E BODIESEL
FONTE: PROJETO BIOPAL (2013)

O material lignocelulósico de EFB é uma importante fonte para conversão a energias renováveis e produtos de valor agregado (HASSAN *et al*, 2013; SUMATHI, CHAI e MOHAMED, 2008; SHUIT *et al.*, 2009).

Inicialmente os cachos frescos são retirados da palmeira e descarregados em vasos de esterilização. Durante o ciclo de esterilização os cachos são aquecidos a 135°C durante 60 minutos, e seus objetivos são: eliminar as enzimas responsáveis, pelo aumento da fermentação dos frutos frescos; soltar os frutos dos cachos; amolecer a polpa para facilitar a extração do óleo e encolher parcialmente as amêndoas para facilitar a separação de sua casca. Depois os cachos são debulhados mecanicamente, resultando em cerca de 22% de cachos vazios. Os frutos seguem para outras operações como digestão, prensagem e filtração para obtenção do óleo (BRASIL. MDA, 2007).

2.6.1 Composição química de EFB

Por se tratar de um material lignocelulósico, a composição química principal dos EFBs é a seguinte: celulose, hemicelulose e lignina, os quais possibilitam o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos serem convertidos em outros produtos de valor agregado. Na TABELA 5 pode-se observar a composição de EFB encontrada por outros autores.

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EFB

CELULOSE (%)	LIGNINA (%)	HEMICELULOSE (%)	EXTRATIVOS (%)	CINZAS (%)	UMIDADE (%)	REFERÊNCIAS
43,8	16,4*	35,0	4,8	-	-	HAMZAH, IDRIS e SHUAN, 2011
39,1	34,4*	23,0	-	-	-	ISROI <i>et al.</i> , 2012
36,1	26,5*	22,4	12,7	3,0	11,0	HASSAN <i>et al.</i> , 2013
39,8	28,1**	17,3	-	-	-	KIM e KIM, 2013
46,0	20,0*	30,4	-	3,61	-	RASHID <i>et al.</i> , 2011

*Lignina solúvel e insolúvel **Lignina insolúvel

Diversos autores observaram a presença de corpos de sílica ligados à superfície de EFB (ISROI *et al.* 2012 ; LAW, DAUD e GHAZALI, 2007; GHAZALI, IWAN ROSLI e LAW, 2009) por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Muitos outros minerais também estavam presentes nas cadeias. A partir das observações microscópicas concluíram que os corpos de sílica estão ligados a uma rede de silício, dentro da matriz fibrosa, e os demais minerais tendem a se concentrar na região adjacente à destes corpos de sílica. Ainda apesar de serem rígidos podem ser removidos da superfície por força mecânica (LAW , DAU e GHAZALI, 2007). A sílica foi sinergicamente removida da superfície de EFB, com as operações de tratamento fúngico (*P. floridanus* strain LIPIMC996) seguido de moagem (moinho de bolas) por Isroi e colaboradores (2012), em comparação com EFB sem pré-tratamento seguido de moagem.

2.6.2 Tratamentos químicos e enzimáticos de EFB para a produção de etanol

No passado, os EFBs possuíam um baixo valor comercial tornando-se um problema devido ao grande volume necessário para a sua estocagem. Geralmente eram utilizados como combustível nas fábricas, entretanto a queima é proibida na Malásia a fim de diminuir a poluição.

Uma possível aplicação para este resíduo lignocelulósico está apresentada na TABELA 6 onde é possível observar que os EFBs são uma excelente fonte açúcares (glicose) e de energia renovável (etanol).

TABELA 6 - RESUMO DOS PRINCIPAIS ESTUDOS COM PRÉ-TRATAMENTO, SACARIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOETANOL

TIPO DE PRÉ-TRATAMENTO	ENZIMA	RENDIMENTO EM GLICOSE APÓS SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA (%)*	ETANOL (g/L)**	REFERÊNCIAS
Ácido-básico (H ₂ SO ₄ -NaOH)	Cellic Ctec 2	84	37,8	KIM e KIM, 2013
Básico (NaOH)	Celulases e β -glicosidases	86,4	48,5	HAN <i>et al.</i> , 2011
Básico-Ácido (NaOH-H ₂ SO ₄)	Celulase	46,8	10,3	KASSIM <i>et al.</i> , 2011
Amônia	Acellerase 1000	41,4	18,6	JUNG <i>et al.</i> , 2011
Explosão à vapor + ácido	Celluclast, Viscozymes e Novozymes 188	81,9	-	HASSAN <i>et al.</i> , 2013

*As condições de hidrólise enzimática foram otimizadas e depois utilizadas tanto em SSF quanto em SHF

** A produção de etanol foi realizada em conjunto com as melhores condições de hidrólise enzimática pré-estabelecidas

No trabalho de KIM e Kim (2013) o tratamento de EFB com ácido sulfúrico 4%, em 20% m/v de substrato, 121°C e 60 min, retirou aproximadamente 90% de hemicelulose presente. O subsequente tratamento básico nas condições de 10 M de hidróxido de sódio, 121°C, após 15 min de reação retirou efetivamente 70% de lignina. A concentração enzimática de 10 a 50 FPU/g da enzima CellicCtec 2 foi testada no EFB pré-tratado. O resultado foi um aumento de 58,8% a 83,9% de rendimento nesta faixa de concentração de enzima. Com 50 FPU/g a concentração de glicose chegou a 70,8 g/L, correspondendo a um rendimento de 83,9% em 48 horas. A SSF da biomassa pré-tratada foi feita com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A e as melhores condições de hidrólise enzimática como citado acima. A produção de etanol em biorreator chegou a 37,8 g/L com 1,5 L de meio contendo 10% (m/v) de fibras EPFB pré-tratadas após 60 h. A produtividade de etanol foi de 0,38 g de etanol/g de fibra EFB seco e 0,45 g de etanol/g de glicose.

Otimizações de tratamento enzimático também constam na literatura. Hassan e colaboradores (2013), estudaram planejamentos variando proporções de enzimas (Celluclast 1.5L, Novozymes 188 e Viscozymes), concentração de enzimas, concentração de substrato e tempo. Após a otimização obtiveram 81,8% de rendimento em glicose, com 35,08 h de reação, 2,5% de enzima (proporção de 0,9 Celluclast 1,5L, 0,03 Viscozymes e 0,07 Novozymes 188, totalizando 22,1 mg de proteína/g de substrato, em EFB pré-tratado com vapor e 5% de ácido acético.

Rashid e colaboradores (2011), encontraram que o pré-tratamento de EFB com hidróxido de sódio a 3% (m/v) foi escolhido dentre outros como o melhor para a sacarificação enzimática. A sacarificação também foi otimizada, levando em conta o tamanho da partícula de EFB, a concentração de EFB, a concentração da enzima, concentração de surfactantes Twen 80 e Triton 100, agitação e temperatura. Através dos melhores resultados apresentados: tamanho da partícula 1mm, concentração enzimática 7% (v/v), agitação 150 rpm e 50°C de temperatura, foi obtido um rendimento de 41,8% em açúcares redutores após 120 h. A enzima celulase utilizada foi produzida por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em biorreator de 30L.

O pré-tratamento de EFB com NaOH para a produção de bioetanol foi estudado por Han e colaboradores (2011). As condições de pré-tratamento e de hidrólise enzimática foram avaliados por metodologia de superfície de resposta e definidas como: 127,7°C de temperatura, 22 min de reação, e concentração de NaOH de 2,9 mol/L. A SSF foi utilizada para a produção de etanol, com as enzimas complexo celulolítico (NS50013) e β -glucosidase (NS50010) – Novozymes -, e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Após este pré-tratamento, com 20% (m/v) de substrato e carga enzimática de 50 FPU/g, foi obtido 63% de rendimento em conversão de celulose em glicose. O estudo ainda diz que concentrações de biomassa interferem na sacarificação, pois as concentrações de substrato de 20 e 10% obtiveram praticamente o mesmo rendimento de sacarificação, e explicam que a atividade das enzimas são inibidas com alta taxa de glicose. Valores acima de 25% m/v de substrato também são descartados devido à dificuldade de agitação do reator.

Etanol celulósico foi produzido após tratamento alcalino por SHF usando a levedura *S. cerevisiae* (KASSIM *et al.*, 2011). As condições do pré-tratamento foram de 1% de NaOH (m/v), 100°C por 2 horas, seguido de hidrólise ácida com 0,7% (v/v) de ácido sulfúrico, 125°C por 2 horas. A hidrólise enzimática foi conduzida sob

temperatura de 50°C, 48 h, agitação de 150 rpm, utilizando celulasas (70FPU/mL) da Novozymes. Um total de 34,4 g/L de açúcares fermentescíveis totais (glicose, xilose e frutose) foram obtidos após as hidrólises ácida e enzimática. O rendimento da produção de etanol a partir do hidrolisado foi de 10,3 g/L, após 72 horas de fermentação a 30°C, pH 4 e agitação entre 100 rpm.

O etanol a partir de EFB também foi produzido após de tratamento com amônia. Os EFBs pré-tratados com amônia aquosa na concentração de 21% (m/m), a 60° C, por 12 h, resultaram em 19,5% e 41,4% de rendimento de glicose durante a sacarificação enzimática por 96 h, utilizando 15 e 60 FPU de celulase (Acellerase 1000), respectivamente. Usando EFB pré-tratado na SSF durante 168 h com 5% (m/v) de substrato (glucana), 60 FPU de celulase e 30 CBU de β -glicosidase por grama glucana, resultou na produção de 18,6 g/L de etanol, 65,6% do rendimento máximo teórico (JUNG *et al.*, 2011).

O hidrolisado obtido de EFBs pode ser empregado com substrato para a produção de biomoléculas de interesse comercial tais como biocombustíveis (bioetanol) (KIM e KIM, 2013), enzimas (SHAHRIARINOUR *et al.*, 2011) , aditivos para ração animal (AWANG *et al.*, 1993), *single cell protein* (KHADIJAH HANIM, SITI JAMILAH HANIN e ZARINA., 2012), entre outros.

Diante destes dados, o estudo das características dos EFBs brasileiros é de suma importância, bem como a otimização da etapa de hidrólise enzimática do resíduo após pré-tratamento e subsequente fermentação para produção de bioetanol, já que assim o processo poderá proporcionar maiores rendimentos de produtos, açúcares fermentescíveis e bioetanol, por quantidade de biomassa utilizada.

2.7 FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DE ETANOL DE 2ª GERAÇÃO A PARTIR DE RESÍDUOS

Bioetanol (álcool etílico, álcool de cereais, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ou etanol) é um biocombustível, o qual pode ser produzido a partir de diversas fontes de biomassa com diferentes tecnologias de conversão. O bioetanol torna-se atraente pois é um

recurso renovável de base biológica e é oxigenado, assim, fornece o potencial para reduzir as emissões de partículas nos motores de ignição por compressão (BALAT *et al.*, 2008).

A concentração de etanol após a fermentação do hidrolisado rico em glicose proveniente da sacarificação da polpa celulósica após pré-tratamento é um parâmetro relevante na viabilidade das biorrefinarias. Fermentações de hidrolisados provenientes da biomassa com 70 g/L de glicose teriam que atingir um máximo de 35 g/L de etanol, bem abaixo do mínimo desejável de concentração, em comparação com a fermentação do caldo de cana que de 120-160 g/L de glicose, conseguem chegar a 60-80 g/L de etanol (SOCCOL *et al.*, 2010). Considerando a produção de etanol de segunda geração em grande escala, o financiamento para os biocombustíveis de 2ª geração e/ou instalações de biorrefinarias devem ser harmonizadas com os programas nacionais e regionais de energias renováveis, que incorporam a produção e utilização de biomassa. Articulações com outras políticas que apoiam este tipo de processo devem ser feitas, a fim de maximizar o apoio para o desenvolvimento de infraestrutura. Políticas nacionais e internacionais devem estar integradas com os setores-chave envolvidos no desenvolvimento e uso de biocombustíveis (SIMS *et al.*, 2010).

O micro-organismo mais usado em bioprocessos de fermentação são as leveduras e, entre as leveduras *S. cerevisiae* são as mais estudadas na fermentação de etanol. Este fato se deve à *S. cerevisiae* ter uma elevada resistência ao etanol, consumir quantidades significativas de substrato em condições adversas, e apresentar uma elevada resistência a inibidores presentes no meio de cultivo (CANILHA *et al.*, 2012; BALAT, 2011). O gênero *Candida* é reportado como produtor de álcool à partir de xilose, um exemplo é a espécie *Candida shehatae* (DELGENES, MOLETTA, e NAVARRO, 1996). Martín, e colaboradores (2010) utilizaram a *Candida tropicalis* NBRC 0618 para fermentar o hidrolisado proveniente de resíduos de oliveiras, obtendo não somente etanol (7,2g de etanol por grama de substrato), como xilitol.

Basicamente existem dois tipos de fermentação para etanol de segunda geração a partir de substratos lignocelulósicos: fermentação separada da sacarificação (SHF – *Separate Hydrolysis and Fermentation*) e fermentação e sacarificação em conjunto (SSF - *Simultaneous Saccharification and Fermentation*)

(BALAT, 2011; SARKAR *et al.*, 2012; SOCCOL *et al.*, 2010). Na TABELA 7 é possível observar as vantagens e desvantagens da SHF e SSF.

TABELA 7 - COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS PRINCIPAIS TIPOS DE FERMENTAÇÃO

PROCESSO DE FERMENTAÇÃO	CARACTERÍSTICAS E VANTAGENS	LIMITAÇÕES
SSF	- Menor custo; - Maiores rendimentos de etanol devido à remoção do produto final que inibe a sacarificação; - Diminuição do número de reatores necessários no processo.	- As condições ótimas das enzimas (hidrólise) e das leveduras (fermentação) são distintas, podendo prejudicar os resultados.
SHF	- Cada processo é realizado separadamente em suas condições ótimas; - Diminuição das interações entre processos.	- Inibição pelo produto final minimiza o rendimento de etanol; - Possibilidade de contaminação devido ao longo período do processo.

Fonte: SARKAR *et al.* (2012)

A maior vantagem do processo SHF é a possibilidade de realizar a hidrólise e a fermentação da celulose com suas próprias condições ótimas. A temperatura ótima para o tratamento enzimático utilizando a celulase é geralmente entre 45 e 50°C, enquanto a temperatura ótima para a maioria dos micro-organismos produtores de etanol encontra-se entre 30 e 37°C (SOCCOL *et al.*, 2010 ; TAHERZADEH e KARIMI, 2007). E como principal desvantagem a inibição da atividade de celulase por açúcares liberados que se acumulam durante a hidrólise enzimática (por exemplo: a glicose não é consumida instantaneamente pelo micro-organismo como na SSF), e principalmente celobiose e glicose, pois com uma concentração de celobiose baixa como 6 g/L, a atividade da celulase é reduzida em 60%. Apesar da glicose também diminuir a atividade da celulase, o efeito inibitório deste açúcar é mais baixo do que a da celobiose. Por outro lado, a glicose é um forte inibidor de β -glicosidase, sendo que um nível de 3 g/L de glicose, a atividade da β -glicosidase é reduzida em 75% (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

O processo de fermentação pode ser conduzido por processos em batelada, batelada alimentada, ou contínuos. A escolha do processo leva em conta as características do micro-organismo, do hidrolisado lignocelulósico e aspectos econômicos (BALAT, 2011)

Industrialmente, a fermentação em *fed-batch*, a adição de açúcares, sem a remoção do caldo fermentativo, no meio conduzido sob fermentação em batelada alimentada é um dos métodos mais comuns para a produção de etanol na indústria. As vantagens deste processo incluem a redução da inibição pelo substrato e pelo produto, alta produtividade de etanol, alta taxa de oxigênio dissolvido, diminuição do tempo de fermentação, altos rendimentos, prolongar o tempo de “vida” do cultivo e melhor controle das variáveis (pH, temperatura, oxigênio dissolvido) (CHANG *et al.*, 2012; STAMBURY, WHITAKER e HALL, 1995; BALAT, 2011).

Uma comparação entre dois tipos de fermentação com o hidrolisado obtido após sacarificação enzimática de sabugo de milho pré-tratado, mostrou que a produção de bioetanol com fermentação em *fed-batch* tem vantagens sobre a fermentação em batelada. A taxa de conversão de etanol a partir da glicose foi maior em *fed-batch* do que em fermentação em *batch*. Além disso, os efeitos da inibição pelo substrato foram menos observados em *fed-batch* do que em *batch*, evidenciados pelo crescimento de células e rendimentos de etanol (CHANG *et al.*, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Substratos

Os resíduos sólidos utilizados neste trabalho são provenientes do beneficiamento do óleo de palma, denominado cacho vazio de palma ou EFB (do inglês *Empty Fruit Bunches*) (FIGURA 12). Estes foram fornecidos pela empresa Biopalma/Vale do estado do Pará, que tem parceria com o Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Divisão de Eng^a de Bioprocessos e Biotecnologia no desenvolvimento do projeto BIOPAL.

O substrato celulósico sintético “Avicel PH 101” (Sigma-Aldrich) foi empregado como substrato padrão nos estudos de hidrólise enzimática.



FIGURA 12 - CACHOS VAZIOS DE PALMA (EFB)
FONTE: O autor (2014)

Enzimas

As preparações enzimáticas comerciais empregadas para a sacarificação dos substratos foram: Cellic® CTec2 (que contém celulases, β -glicosidases e hemicelulases), gentilmente doada pela Novozymes Latin América (Novozymes,

Araucária, Brasil); Celluclast 1.5L® e Novozymes 188®, celulasas e celobiase respectivamente (Sigma-Aldrich).

Micro-organismos

A levedura, utilizada na produção de bioetanol a partir do hidrolisado enzimático de EFB, foi a *Candida pelliculosa* syn. *Pichia anomala* CCT 7734, que foi depositada na Coleção de Culturas Tropical. Também foi usada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* YB 2293, pertencente ao Banco de Linhagens do Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB), UFPR.

3.2 MÉTODOS

Na FIGURA 13 é possível observar o fluxograma resumido das principais etapas desenvolvidas neste trabalho, onde os cachos vazios de palma (EFB), passaram por etapas de: moagem, separação, pré-tratamento e hidrólise enzimática para obtenção de um hidrolisado rico em glicose para futura aplicação na produção de bioetanol.

O primeiro pré-tratamento foi o ácido com HCl (2,5% v/v), seguido do básico com NaOH (5% m/v), em iguais condições de temperatura e pressão (121°C e 1 atm). Os substratos obtidos após os pré-tratamentos foram filtrados e lavados sucessivamente em diferentes etapas até se chegar em pH 7. A água de lavagem foi analisada quanto aos compostos fenólicos presentes e sua inibição enzimática. Em seguida, a fração insolúvel obtida, contendo celulose e parte de lignina e hemicelulose não hidrolisadas, foi submetida hidrólise enzimática com enzimas comerciais cujas condições foram otimizadas tais como o tempo de hidrólise, a concentração de enzima(s) e de substrato, tendo como variável resposta a concentração de açúcares (glicose) final. Em paralelo, a otimização foi igualmente realizada com o substrato sintético Avicel para comparação dos resultados da sacarificação enzimática no substrato pré-tratado e da ação enzimática. Também foi realizado um experimento de hidrólise enzimática do substrato EFB pré-tratado com enzimas produzidas no LPB.

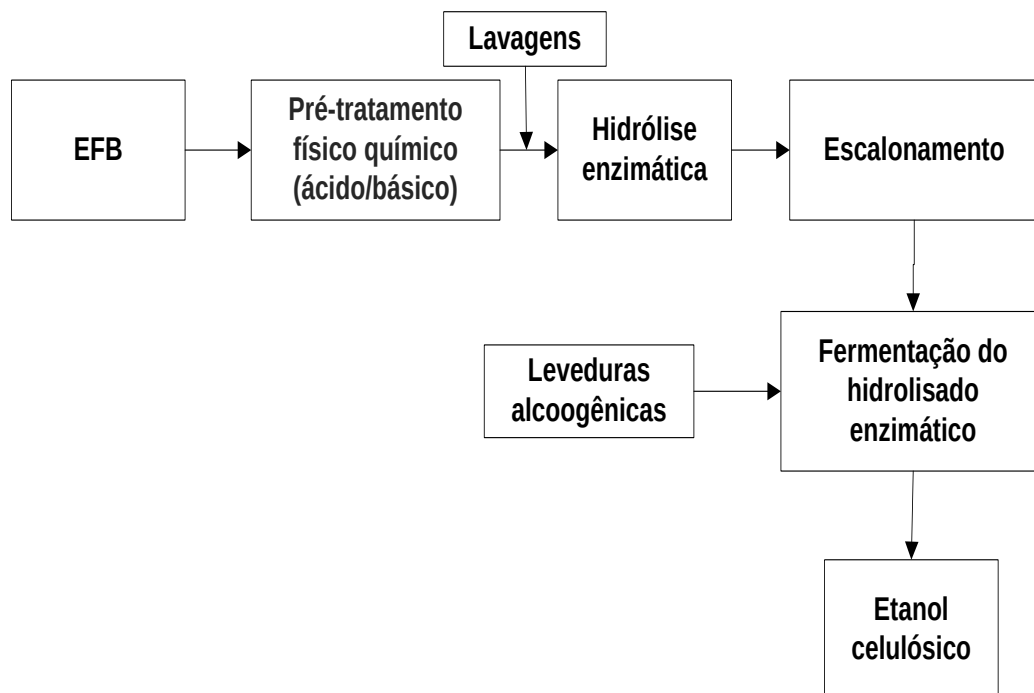


FIGURA 13 - FLUXOGRAMA DAS PRINCIPAIS ETAPAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO E ENZIMÁTICO PARA PRODUÇÃO DE HIDROLISADO DE EFB PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO A PARTIR DE EFB

As condições otimizadas foram empregadas em um estudo onde aumentou-se a escala para um volume de 500 mL com o objetivo de testar o comportamento do processo de hidrólise em um volume maior. Em seguida, foi avaliada a fermentabilidade do hidrolisado enzimático para produção de etanol. Os parâmetros cinéticos: pH, concentração de células por peso seco e formação do produto, foram avaliados durante 96 horas de fermentação.

As amostras de EFB *in natura* e dos pré-tratados quimicamente foram caracterizados em relação às concentrações de celulose, hemicelulose e lignina. A informação acerca das mudanças na morfologia decorrentes dos pré-tratamentos foram registradas mediante documentação fotográfica, e também foi realizada uma avaliação morfológica com a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3.2.1 Preparação da palma

Os cachos de palma vazios (EFB) (FIGURA 14) previamente secos à 45°C em estufa de circulação de ar *overnight*, foram processados em moinho de facas, em peneira de 2 mm, separados na fração de 0,35 a 0,85 mm (42-20 mesh, respectivamente) e acondicionados em frascos de vidro.

3.2.2 Caracterização química dos EFBs

A eficiência dos pré-tratamentos químicos e enzimáticos em relação aos componentes presentes no EFB *in natura* (celulose, hemicelulose e lignina), foi acompanhada pela análise destes componentes em cada uma das etapas. Análises de cinzas e umidade também foram realizadas.

As amostras foram enviadas ao Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal do Paraná, e caracterizadas pelo método de Van Soest. Neste método são dosados os teores de lignina, fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN) determinados pelas metodologias de Van Soest (1967) e Van Soest e Wine (1967). Através desta metodologia com o uso do detergente neutro, ocorre a solubilização do conteúdo celular da amostra, sendo o resíduo remanescente constituído de celulose, hemicelulose e lignina. Com o detergente ácido, o que se determina é a fibra em detergente ácido (FDA), que solubiliza o conteúdo celular e a hemicelulose, portanto, o restante é formado por celulose e lignina. Enfim, a lignina é determinada com a digestões da amostras em ácido sulfúrico 72%.

As concentrações relativas de FDA e FDN permitem calcular a quantidade de celulose e hemicelulose nas amostras segundo as Equações 1 e 2:

$$\% \text{ Celulose} = \% \text{FDA} - \% \text{Lignina} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\% \text{ Hemicelulose} = \% \text{FDN} - \% \text{Lignina} - \% \text{Celulose} \quad (\text{Equação 2})$$

Para determinação do teor de cinzas, as amostras secas de EFB foram transferidas para cadinhos, previamente tarados, e mantidos em mufla à 575°C durante 2 horas, segundo a norma NREL/TP-510-42622 (SLUITER *et al.*, 2008). Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada. O teor de cinzas foi obtido pela diferença de massa entre o cadinho com cinzas e o cadinho vazio, que foi expressa em relação à quantidade de amostra inicial (base seca).

Uma massa definida de material celulósico foi pesada em papel filtro previamente tarado. Este material foi colocado em estufa a 105°C por no mínimo 3 h para a eliminação da umidade. Logo após, o material foi resfriado em dessecador sob vácuo, pesado e a massa seca foi calculada em relação à massa do material original.

Todas as análises da composição, umidade e cinzas foram realizadas em triplicata. Os valores relatados correspondem à média dos valores obtidos.

3.2.3 Análise estrutural de EFB por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras do EFB *in natura* e pré-tratadas (tratamento químico e enzimático) com uma granulometria entre 42 a 20 *mesh*, foram secas em estufa de circulação de ar a 45°C previamente à análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As amostras foram fixadas em suporte de alumínio com fita dupla face de cobre. As mesmas foram submetidas ao recobrimento com 30 nm de ouro por um metalizador Balzers (Modelo SCD030 – *Balzers Union* FL 9496 Balzers – Alemanha).

As fotomicrografias de MEV foram obtidas em um equipamento Jeol, Modelo JSM – 6360LV *Scanning Electron Microscope* (300 mil x) – com uma potência do feixe de elétrons de 15 kV (equipamento disponível no Centro de Microscopia Eletrônica – CME - UFPR).

3.2.4 Análise química elementar de EFB por EDS – *Energy Dispersion Spectroscopy*

A análise por espectroscopia de dispersão Espectroscopia por Dispersão em Energia (EDS) permite a análise dos elementos químicos presentes nas amostras, e foi conduzida para constatar a presença de silício (Si), componente da sílica, que pode influenciar o desempenho das enzimas celulolíticas.

O procedimento para a preparação das amostras é semelhante ao empregado para as amostras submetidas à MEV. As amostras de EFB *in natura* e pré-tratadas (tratamento químico) com uma granulometria entre 20 e 42 *mesh* foram secas em estufa de circulação de ar a 45°C e fixadas em suporte de alumínio com fita de carbono, sem metalização.

As análises químicas elementares por EDS (*Energy Dispersion Spectroscopy*) foram realizadas com resolução de 134 eV e detector Pioneer Si(Li), acoplado ao equipamento de MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM 6360-LV) pertencente ao Centro de Microscopia Eletrônica – CME – UFPR).

3.2.5 Pré-tratamento com ácido diluído dos EFB

Visando a remoção de hemicelulose, amostras de EFB foram submetidas ao tratamento ácido mediante aplicação de solução de ácido clorídrico (HCl) a 2,5% v/v, em uma relação sólido/liquido de 20% (m/v). O pré-tratamento foi realizado em vidros do tipo “shot” colocados em autoclave nas seguintes condições: 121°C e 1 atm por 60 min. Após separação da fração líquida, denominada água residual da hidrólise ácida, ajustou-se o pH do resíduo sólido com lavagens sucessivas de água deionizada até pH 7. A água residual da hidrólise ácida foi analisada por CLAE para verificar a quantidade de açúcares da hemicelulose que estariam presentes na amostra. Finalmente, o EFB pré-tratado foi seco em estufa de circulação a 45°C *overnight*. Uma parte foi destinada à caracterização e a outra foi encaminhada ao próximo tratamento.

3.2.6 Pré-tratamento alcalino dos EFB

O tratamento básico com NaOH diluído foi conduzido com o EFB pré-tratado com ácido com o objetivo de remover a lignina. Foram utilizadas soluções de NaOH 5% m/v, com 10% de teor de sólidos (EFB proveniente do pré-tratamento ácido), que foram colocados em vidros do tipo “shot”. As condições do processo são as mesmas do pré-tratamento ácido: 121°C e 1 atm por 60 min.

Este material foi filtrado, gerando o resíduo líquido denominado: líquido residual da hidrólise básica, e o resíduo sólido que foi submetido às operações de lavagem controladas com água deionizada. As lavagens foram realizadas da seguinte maneira: o sólido foi adicionado de água na proporção de 10% m/v, submetido à agitação mecânica (Equipamento Ultra-Turrax) por 15 min e filtrado. O pH final de cada suspensão foi medido à cada processo, então o EFB foi filtrado e submetido à nova adição de água até que o pH final chegou a 7. Após estabilização do pH o EFB foi filtrado e seco em estufa de circulação a 45°C *overnight*. O substrato foi acondicionado livre de umidade e denominado a partir de então de EFB_t (EFB pré-tratado com ácido e base).

Na literatura encontram-se relatos de que o pré-tratamento básico produz compostos fenólicos que inibem a atividade enzimática (ALMEIDA *et al.*, 2007; XIMENES *et al.*, 2010). As lavagens após o pré-tratamento para a remoção de possíveis interferentes da hidrólise enzimática e também para o ajuste do pH do resíduo para 6,5-7 são reportadas na literatura (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; JUNG *et al.*, 2011; TANIGUCHI *et al.*, 2010). Portanto, com a finalidade de caracterizar estas águas e verificar a composição destas, previamente ao tratamento enzimático, amostras de cada etapa foram guardadas para análise de fenóis totais presente nas águas de lavagem. A atividade da enzima Cellic Ctec2 s foi determinada em cada amostra de modo a verificar se a presença destes componentes afetaria ou não a atividade enzimática

3.2.6.1 Caracterização das águas de lavagem do resíduo EFB após tratamento básico

Os resultados obtidos em triplicada da caracterização das águas de lavagem do EFB após tratamento básico, foram analisados por comparação de médias dos valores obtidos através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) através do software estatístico GraphPad Prism 5.

Análise de fenóis totais presentes nas amostras das águas de lavagem

O conteúdo de compostos fenólicos totais presentes tanto no líquido residual da hidrólise básica, quanto nas águas de lavagem após pré-tratamento básico, foi determinado utilizando o reativo de Folin-Ciocalteu seguindo a metodologia modificada de Singleton e Rossi (1965). Para 500 μL de cada amostra (triplicata) foram adicionados 2,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v), e após cinco minutos adicionou-se mais 2 mL de Na_2CO_3 (7,5% m/v). As amostras permaneceram armazenadas no escuro à temperatura ambiente durante 60 min. A absorbância de todas as amostras foi medida a 740 nm utilizando um espectrofotômetro de UV-SP2000. A curva padrão foi determinada utilizando as concentrações de 3,9, 7,8, 15,6, 31,2, 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico. A água destilada foi utilizada como o branco do espectro. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por mL de amostra.

Foram preparados igualmente os brancos das amostras de cada lavagem. Neste ensaio os reagentes Folin-Ciocalteu e Na_2CO_3 foram substituídos por água.

Os compostos fenólicos também foram dosados na água residual da hidrólise ácida e na água de lavagem do substrato *in natura* (utilizando a proporção de 10% m/v com água destilada).

Determinação da atividade da enzima Cellic CTec2 na presença das águas de lavagem contendo compostos fenólicos

A atividade da celulase, as quais foram adicionadas às águas de lavagens para testar o efeito inibitório dos compostos fenólicos ali presentes e do pH, foi determinada de acordo com o método descrito por GHOSE (1987).

As águas de lavagem de EFBs obtidas após cada etapa de lavagem do resíduo proveniente do tratamento básico, foram adicionadas na reação no lugar da solução tampão (1,0 mL) em triplicata. O controle da atividade enzimática, branco da enzima, foi preparado com a Cellic CTec2 e tampão citrato sódio 0,05 M e pH 4,8. A concentração da enzima $1,2 \times 10^{-3}$ g/L foi utilizada igualmente para o controle e também nos diferentes ensaios, portanto o branco da enzima foi o mesmo para todas as amostras. O branco do espectrofotômetro foi preparado com as amostras em lugar do tampão.

Neste método utiliza-se papel de filtro (PF) Whatman nº1 (50 mg ou 1 x 6,0 cm) como substrato para celulase, e o ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) para quantificar açúcares redutores totais (ART) liberados pela reação. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro SP-2000. As atividades foram expressas em unidades por mililitro (U/mL).

Uma unidade internacional (U) de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para converter 1 μ mol de produto (glicose) por minuto. Na TABELA 8 estão apresentados os procedimentos utilizados nos ensaios enzimáticos das amostras de águas de lavagens provenientes do tratamento químico de EFBs.

TABELA 8 - ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA PRESENTE EM ÁGUAS DE LAVAGENS

ENSAIO	BRANCO DA ENZIMA	BRANCO DO ESPECTROFOTÔMETRO
1,0 mL de amostra*	1,0 mL de tampão	1,5 mL de amostra*
0,5 mL da enzima	0,5 mL da enzima	Adição de 3 mL do DNS
Banho a 50 °C	Adição de 3 mL do DNS	Ebulição 5 min
Adição do o PF	Ebulição 5 min	Adição de 20 mL de água
Incubação a 50°C 60 min	Adição de 20 mL de água	Leitura a 540 nm
Adição de 3 mL do DNS	Leitura a 540 nm	
Ebulição 5 min		
Adição 20 mL de água		
Leitura a 540 nm		

*Diferentes águas residuais de lavagem.

De posse das leituras das absorbâncias obtidas após hidrólise enzimática do papel filtro com as águas de lavagem substituindo o tampão, e utilizando a equação prévia obtida da curva padrão de glicose (APÊNDICE II), foi possível determinar a concentração dos ART liberada pela enzima, e também utilizar este valor para converte-lo em atividade enzimática através da Equação 3:

$$\text{FPU} = [\text{glicose liberada}] \times 0,185 \quad (\text{Equação 3})$$

Uma derivação de:

$$1,0 \text{ mg glicose} = 1,0 / [0,18 \times 0,5 \times 60] \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = 0,185 \text{ unidades.mL}^{-1}.$$

3.2.7 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise de etanol e açúcares

O etanol e os açúcares individuais (glicose, celobiose, arabinose e xilose) foram quantificadas por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), em um cromatógrafo da marca Shimadzu, com detector de IR e volume de amostra no injetor de 20µL, usando a coluna Aminex HPX-87 H, fase móvel de H₂SO₄ a 5 mM, com vazão de 0,6 mL/min, a 60°C. As amostras foram diluídas em água deionizada

de acordo com suas concentrações, centrifugadas (10.000 rpm, 10 min) e filtradas utilizando filtros de acetato de celulose com poros de 0,22 μm . A concentração de açúcares e de etanol finais foram obtidas pelo produto de suas respectivas concentrações individuais pela diluição utilizada. Os padrões utilizados foram: glicose, celobiose, arabinose, xilose e etanol, em duas concentrações 1 e 2 g/L. Os tempos de retenção podem ser vistos no Apêndice I.

3.2.8 Tratamento enzimático dos substratos Avicel e EFB pré-tratado (EFB_t)

A otimização das condições do tratamento enzimático da celulose presente no substrato sintético Avicel e nos EFBs pré-tratados com enzimas comerciais foi avaliada com o suporte do software *Statística* 5.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK). A resposta empregada para a degradação da celulose foi a recuperação de glicose presente.

Para as respostas geradas, um modelo pautado em regressão linear múltipla foi proposto e sua significância estatística foi avaliada por Análise de Variância (ANOVA). As superfícies de resposta foram utilizados para definir as condições, que separadamente e simultaneamente, maximizam a variável resposta.

Os delineamentos experimentais foram planejados com as variáveis: concentração das enzimas (Cellic CTec2 e Celuclast 1.5L em conjunto com a Novozymes 188), a concentração de substrato (Avicel e EFB após pré-tratamento ácido e básico) e o tempo.

Inicialmente as otimizações foram realizadas somente com o substrato sintético Avicel para cada uma das enzimas: Cellic CTec2 e Celluclast 1.5L + Novozymes 188. Para o substrato EFB_t as otimizações partiram das matrizes pré-otimizadas com o substrato Avicel, e foram repetidas com as mesmas condições.

Com as otimizações esperou-se aumentar a concentração da glicose (g/L) obtida após a hidrólise enzimática. Principalmente para o EFB_t as otimizações visam produzir um hidrolisado passível de ser utilizado para a produção de etanol celulósico.

Os experimentos foram conduzidos em Erlenmeyers de 250 mL, com volume total de 30 mL, contendo o substrato, o tampão e a enzima, nos respectivos níveis

estipulados para cada ensaio. Os frascos Erlenmeyers foram colocados em shaker com banho maria com temperatura de 50°C e 100 rpm de agitação. Após o término da hidrólise enzimática, o material foi fervido por 5 min para a desnaturação das enzimas. Na FIGURA 14 é possível observar o tipo de equipamento utilizados e como os frascos Erlenmeyers foram dispostos durante a sacarificação enzimática.



FIGURA 14 - SHAKER TIPO BANHO-MARIA E A DISPOSIÇÃO DOS ERLENMEYERS NO INTERIOR

A separação do sólido e do sobrenadante, hidrolisado, foi feita por centrifugação à temperatura ambiente, velocidade de 4.500 rpm por 15 min.

A análise dos açúcares foi realizada por CLAE conforme o item 3.2.7.

3.2.9 Determinação da atividade enzimática das enzimas comerciais empregadas na hidrólise enzimática de EFB e Avicel

3.2.9.1 Atividade celulolítica das enzimas empregadas no tratamento enzimático de EFB e Avicel

As enzimas comerciais foram previamente caracterizadas quanto à atividade enzimática antes de seu emprego no tratamento enzimático de EFBs. A atividade das celulases foi determinada de acordo com o método descrito por GHOSE (1987), utilizando papel de filtro Whatman nº1 (50 mg ou 1 x 6,0 cm) como substrato para celulase, e o ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) como reagente empregado para quantificar açúcares redutores totais (ART) por método espectrofotométrico. O resultado foi expresso em unidades de papel filtro, FPU (*Filter Paper Unit*) ou atividade em papel filtro, por mililitro (FPU/mL). Para a celulase, uma unidade da atividade de enzima (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente, isto é, 2,0/0,18016 μ mol de 50 mg de papel de filtro por 0,5 mL de enzima diluída em 60 minutos de reação.

A curva padrão foi preparada de acordo com o APÊNDICE I. O branco para zerar o espectrofotômetro foi preparado usando 0,5mL de água destilada em substituição a solução de glicose.

Para o cálculo das atividades enzimáticas em FPU/mL das duas enzimas (Celluclast 1.5L e Cellic CTec2), foram feitas diluições que liberassem concentrações acima e abaixo de 2 mg de açúcares redutores totais (ART).

Na TABELA 9 é possível observar como foram realizados os ensaios para cada diluição. Nos tubos reacionais utilizados para a determinação da atividade em FPU das enzimas citadas, foi adicionado 1,0 mL de tampão citrato e, em seguida, 50 mg de papel de filtro. Os tubos foram levados ao banho maria a 50°C, e então adicionou-se 0,5 mL de cada uma das diluições da solução estoque de glicose ficando imersos por exatamente 60 minutos. Após este período foi adicionado 3,0 mL do reagente colorimétrico (DNS) e os tubos foram levados à ebulição por 5 min. Após o resfriamento das amostras, 20 mL de água deionizada foram adicionados.

Assim, os tubos foram agitados e as amostras lidas a 540 nm em espectrofotômetro SP-2000.

TABELA 9 - PROCEDIMENTOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

ENSAIO	BRANCO DA ENZIMA	BRANCO DO ESPECTROFOTÔMETRO
1,0 mL de tampão citrato	1,0 mL de tampão	1,5 mL de tampão
0,5 mL da enzima*	0,5 mL da enzima*	Adição de 3 mL do DNS
Banho a 50 °C	Adição de 3 mL do DNS	Ebulição 5 min
Adição o PF	Ebulição 5 min	Adição de 20 mL de água
Incubação a 50°C 60 min	Adição de 20 mL de água	Leitura a 540 nm
Adição de 3 mL do DNS	Leitura a 540 nm	
Ebulição 5 min		
Adição de 20 mL de água		
Leitura a 540 nm		

*CellicCtec 2 ou Celluclast 1,5L

De posse das leituras das absorbâncias obtidas após hidrólise enzimática do papel filtro e utilizando a equação obtida da curva padrão de glicose (APÊNDICE III) foi possível determinar a concentração dos ART liberados pela enzima em cada um dos ensaios. A partir destes valores, foi construído um gráfico semilog relacionando as diluições da enzima e suas respectivas concentrações de açúcar redutor (determinadas por DNS) liberados por 0,5 mL de enzima diluída, que serviu para determinar, por regressão linear (interpolação), a diluição da enzima necessária para liberar 2 mg glicose no meio reacional. Encontrada esta diluição foi aplicada a Equação 4 para a determinação de atividade da enzima:

$$\text{FPU/mL} = \frac{2,0}{(0,18016 \cdot 0,5 \cdot 60 \cdot [\text{enzima diluída}])} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{FPU/mL} = \frac{0,37}{[\text{enzima diluída}]}$$

3.2.9.2 Atividade da enzima β -glicosidase

A atividade da enzima β -glicosidase/celobiase foi determinada para as enzimas Novozymes 188 e Cellic CTec2, segundo o protocolo proposto por GHOSE (1987). Alíquotas de 1 mL da solução enzimática, em diluições diferentes, foram pré-incubadas a 50°C e a reação foi iniciada com a adição de 1 mL de uma solução de celobiose a 15 mmol/L em tampão citrato 0,05M, pH 4,8. Após 30 min, a reação foi encerrada com a imersão dos tubos em água fervente por 5 min.

Os açúcares solúveis produzidos foram analisados por CLAE como no item 3.2.7 (PITARELO *et al.*, 2012). No APÊNDICE IV encontra-se a metodologia de determinação da atividade.

Uma unidade da atividade de β -glicosidase (CBU) baseia-se na liberação de exatamente 1,0 mg de glicose, isto é, 0,5/0,18016 μ mol de celobiose convertida por 1,0 mL de enzima diluída em 30 minutos de reação.

A atividade enzimática de Novozymes 188 e Cellic Ctec2 foi calculada através da Equação 5:

$$\text{CBU/mL} = [\text{glicose liberada}] \times 0,0926 \quad (\text{Equação 5})$$

Uma derivação de :

$$1,0 \text{ mg glicose} = 0,5 \text{ de celobiose convertida} / [0,18 \times 1,0 \times 30] \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = 0,0926 \text{ U/mL.}$$

3.2.10 Otimizações das condições do processo de hidrólise enzimática do substrato Avicel

3.2.10.1 Otimização da hidrólise enzimática de Avicel com as enzimas comerciais Celluclast 1.5L e Novozymes 188

Para as enzimas Celluclast 1.5L e Novozymes 188 foram realizados dois planejamentos. A primeira etapa consistiu em um planejamento fatorial incompleto 2^{4-1} contendo 2 níveis, 4 variáveis, e três repetições nas condições do ponto central, totalizando 11 experimentos (TABELA 10). As variáveis independentes estudadas foram o tempo de hidrólise, as concentrações das duas enzimas e do substrato (Avicel), a variável dependente foi a concentração de glicose.

A segunda etapa da otimização foi conduzida por meio da metodologia de superfície de resposta gerada por delineamento estatístico experimental chamado Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR). O planejamento DCCR é composto por 3 fatores, acima citados, em 5 níveis e, 8 pontos fatoriais, cinco replicatas do ponto central e seis pontos axiais, totalizando 19 experimentos (TABELA 11). Nesta fase, a concentração do substrato Avicel foi fixada em 15% (m/v), e as variáveis foram as concentrações das duas enzimas e o tempo.

TABELA 10 - NÍVEIS DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO – HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE AVICEL COM AS ENZIMAS CELLUCLAST 1.5L E NOVOZYMES 188 – 1ª ETAPA

NÍVEL	TEMPO (h)	% CELLUCLAST 1.5L (v/v)*	% NOVOZYMES 188 (v/v)*	% AVICEL (m/v)*
-1	24	1	0	5
0	48	2,5	0,2	10
1	72	4	0,4	15

*v=volume de tampão citrato pH 4,8

TABELA 11 - NÍVEIS DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO DCCR - HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE AVICEL COM AS ENZIMAS CELLUCLAST 1.5L E NOVOZYMES 188 – 2ª ETAPA

NÍVEL	TEMPO (h)	%CELLUCLAST 1.5L (v/v)*	% NOVOZYMES 188 (v/v)
-1,7	6,0	0,5	0,0
-1,0	19,4	1,2	0,2
0,0	38,9	2,2	0,5
1,0	58,5	3,3	0,8
1,7	72,0	4,0	1,0

*v=volume de tampão citrato pH 4,8.

3.2.10.2 Otimização das condições da hidrólise enzimática de Avicel com a enzima comercial Cellic CTec2

Para a otimização da hidrólise enzimática com a enzima Cellic CTec2 foi empregado um DCCR (Delineamento composto Central Rotacional). O planejamento DCCR foi composto por 5 níveis e os 3 fatores, acima citados, 8 pontos fatoriais, cinco replicatas do ponto central e seis pontos axiais, totalizando 19 experimentos (TABELA 12). As variáveis independentes estudadas foram o tempo de hidrólise, a concentração da enzima e do substrato. A variável dependente estudada foi a concentração de glicose.

TABELA 12 – NÍVEIS DOS FATORES ESTUDADOS NO DCCR PARA A OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO AVICEL COM A ENZIMA CELLIC CTEC2

NÍVEIS	TEMPO (h)	%CELLIC CTEC2 (v/v)*	% AVICEL (m/v)**
-1,7	6,0	0,5	5,0
-1,0	19,4	1,2	7,0
0,0	38,9	2,2	10,0
1,0	58,5	3,3	13,0
1,7	72,0	4,0	15,0

*v=volume de tampão citrato pH 4,8.

3.2.11 Estudo da otimização das condições do processo de hidrólise enzimática dos EFB_ts

Nesta etapa foi utilizada a mesma estratégia de hidrólise enzimática do substrato Avicel entretanto, o substrato utilizado foi EFB pré-tratado com ácido e base.

O estudo de otimização foi realizado em duas etapas com dois planejamentos experimentais do tipo DCCR: um para as enzimas Celluclast 1,5L em conjunto com a Novozymes 188 e outro para a enzima Cellic CTec2.

A partir destes resultados foi escolhida a melhor condição de processo enzimático, a que gerou melhor resposta, entre as enzimas utilizadas, também considerando, além da concentração de açúcares final, o valor econômico das enzimas.

3.2.11.1 Otimização da hidrólise enzimática da EFB_t com as enzimas comerciais Celluclast 1.5L e Novozymes 188

Na TABELA 13 são apresentados os níveis dos fatores estudados para a otimização do processo de hidrólise de EFB_t com as enzimas Celluclast 1.5L e Novozymes 188.

TABELA 13 - NÍVEIS DOS FATORES ESTUDADOS NO DCCR PARA OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE EFB_t 15% (m/v) COM AS ENZIMAS CELLUCLAST 1.5L E NOVOZYMES 188

NÍVEL	TEMPO (h)	%CELLUCLAST 1.5L (v/v)*	% NOVOZYMES 188 (v/v)
-1,7	6,0	0,5	5,0
-1,0	19,4	1,2	7,0
0,0	38,9	2,2	10,0
1,0	58,5	3,3	13,0
1,7	72,0	4,0	15,0

*v=volume de tampão citrato pH 4,8

3.2.11.2 Otimização da hidrólise enzimática de EFB_t com a enzima comercial Cellic CTec2

Na TABELA 14 são apresentados os níveis dos fatores estudados para a otimização do processo de hidrólise de EFB_t com a enzima Cellic CTec2.

TABELA 14 – NÍVEIS DOS FATORES ESTUDADOS NO DCCR PARA OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE EFB_t COM A ENZIMA CELLIC CTEC2

NÍVEIS	TEMPO (h)	%CELLIC CTEC2 (v/v)*	% EFB _T (m/v)**
-1,7	6,0	0,5	5,0
-1,0	19,4	1,2	7,0
0,0	38,9	2,2	10,0
1,0	58,5	3,3	13,0
1,7	72,0	4,0	15,0

*v=volume de tampão citrato pH 4,8.

**EFB_t = EFB pré-tratado com ácido e base

3.2.12 Estudo de variação de escala da hidrólise enzimática de EFB_t

Um estudo de variação de escala do processo de hidrólise enzimática de EFB_t foi conduzido em um pequeno tanque agitado de volume 1 L. A melhor condição de sacarificação foi proporcionada pela enzima Cellic CTec2 visando um melhor rendimento da hidrólise enzimática da celulose do EFB_t.

O sistema é composto por um “reator” de volume 1L com tampa, fixada por quatro parafusos, o qual fica submerso na água com temperatura controlada a 50°C. O reator possui um orifício por onde passa uma haste contendo agitadores do tipo hélice que promovem a agitação. A velocidade de agitação foi fixada em 100 rpm (FIGURA 15). Os valores foram ajustados para um volume de 500 mL de tampão citrato pH 4,8.

Terminado o tempo de reação, a temperatura do banho foi ajustada para 100°C e após o início da fervura foram contados 5 minutos, encerrando o processo. Após o resfriamento, a suspensão foi filtrada à vácuo e o hidrolisado foi separado do sólido.

O resíduo sólido desta etapa foi seco em estufa de circulação de ar a 45°C *overnight* e analisado quanto à composição química e morfológica (MEV). O hidrolisado foi analisado por CLAE como no item 3.2.7.

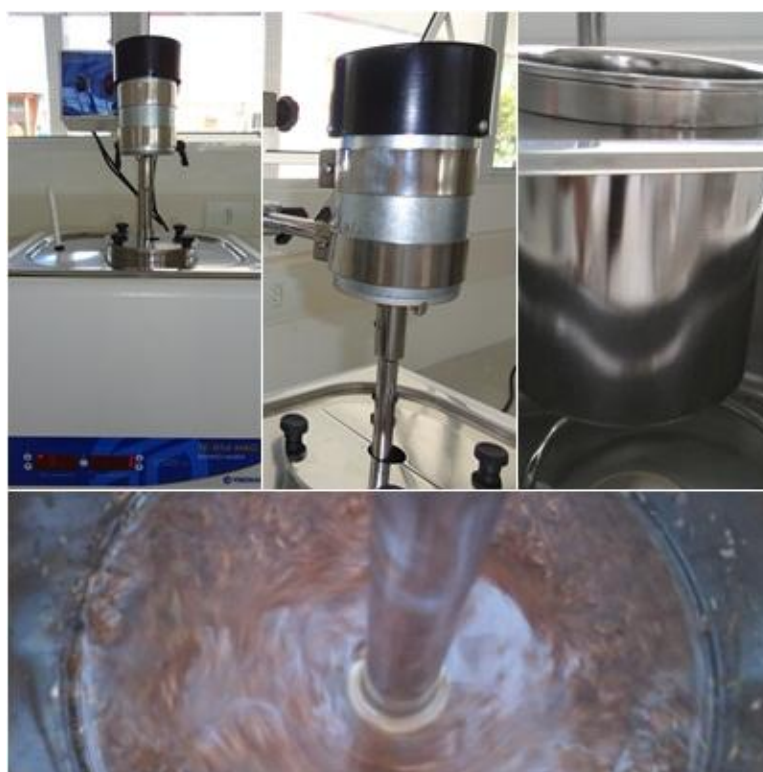


FIGURA 15 - EQUIPAMENTO UTILIZADO NO ESCALONAMENTO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO EFB_t: BANHO MARIA ACOPLADO A UM AGITADOR MECÂNICO E DISPOSIÇÃO DA AMOSTRA NO RECIPIENTE

3.2.13 Comparação do tratamento enzimático do EFB_t com a enzima produzida no LPB

Após a otimização da hidrólise enzimática com o EFB_t, foi realizado um teste repetindo a melhor condição com um extrato enzimático obtido pelo aluno Marcelo

Maceno, durante a realização do subprojeto C-1 intitulado “Produção de Celulases a partir de Resíduos de Palma”, no LPB.

O extrato enzimático foi produzido pelo micro-organismo *Phanerochaete sp.* PH-HD, que pertence ao banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB). Assim, a hidrólise enzimática ocorreu com o extrato enzimático na concentração de 2,4% (v/v) em tampão citrato pH 4.8, com 15% (m/v) de EFB_t em 38,9 h de hidrólise. As condições de hidrólise foram 50°C e 100 rpm.

Após o término da reação as amostras foram centrifugadas a 4500 rpm, e o sobrenadante foi encaminhado à análise de açúcares por CLAE.

3.2.14 Cálculo do rendimento do tratamento enzimático

Para cada concentração das enzimas utilizadas, Celluclast 1.5L, Cellic CTec2 e Novozymes 188, foi realizado um controle para a quantidade de glicose presente. Estes valores foram descontados levando em consideração a concentração individual das enzimas em casa ensaio dos planejamentos.

O rendimento da sacarificação pode ser expresso em % de liberação de glicose a partir de celulose, por meio da Equação 6 (CHEN, XIA, e XUE, 2007):

(Equação 6)

$$\begin{aligned} &\text{Rendimento da sacarificação enzimática \%} \\ &= \frac{\text{glicose liberada (mg)} \times 0,9 \times 100}{\text{Peso da amostra (mg)} \times \text{conteúdo de glucana(\%)}} \end{aligned}$$

O rendimento pode ser simplesmente calculado como a relação entre a concentração de glicose final e a concentração inicial de substrato, EFB pré-tratado, inicial, através da Equação 7:

$$\text{Rendimento da sacarificação enzimática} = \frac{\text{g de glicose}}{\text{g de substrato}} \quad (\text{Equação 7})$$

3.2.15 Testes com leveduras alcoogênicas para a produção de etanol de 2ª geração a partir do hidrolisado enzimático de EFBt

Para a seleção da melhor cepa para a produção de etanol utilizou-se primeiramente um meio sintético modificado (ALFANI *et al.*, 2000).

Duas leveduras alcoogênicas, *Candida pelliculosa* CCT 7734 e *Saccharomyces cerevisiae* YB 2293, foram testadas quanto à sua capacidade em produzir etanol. Após a comparação, a cepa que apresentou o melhor resultado foi utilizada nos experimentos de fermentação do hidrolisado obtido do tratamento enzimático de EFBs pré-tratados para a produção de álcool de 2ª geração.

3.2.15.1 Conservação das cepas

O meio de cultura utilizado para a conservação das cepas foi o YMA (Yeast Extract Malt Agar), com a seguinte composição: glicose 1,0% (m/v), peptona 0,5% (m/v), extrato de levedura 0,3% (m/v) e extrato de malte 0,3 %, agar 2% (m/v) em água deionizada. Os compostos foram dissolvidos por aquecimento até a fervura e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min. Em seguida, o meio foi distribuído em tubos de ensaio previamente esterilizados e estes foram posteriormente armazenados sob refrigeração a 4°C.

3.2.15.2 Condições de crescimento das cepas utilizadas

As cepas foram repicadas em tubos inclinados esterilizados com meio sólido YMA e incubadas em estufa durante 24 a 48 h a 28°C. Este procedimento foi executado em todos os momentos que antecederam os ensaios, de forma a manter a cultura viável e/ou obter biomassa suficiente para os procedimentos de inoculação.

3.2.15.3 Preparo do pré-inóculo de cada levedura utilizada

O preparo do pré-inóculo foi realizado por transferência de duas alçadas do tubo inclinado contendo a levedura para Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio de crescimento YPG (*Yeast Potato Glucose*). O meio em questão é composto por 20 g/L de glicose, 20 g/L peptona e 10 g/L de extrato de levedura em água destilada (KASSIM *et al.*, 2011). O pH foi ajustado para 5,5 previamente a esterilização do meio. O volume do pré-inóculo utilizado foi de 10% (v/v) em relação ao volume do meio. Os frascos Erlenmeyer foram incubados a 28°C sob agitação orbital de 120 rpm por 24 h, obtendo biomassa suficiente para os procedimentos de inoculação.

3.2.15.4 Produção de etanol em meio sintético

Os ensaios iniciais de fermentação foram realizados com glicose comercial na concentração de 50 g/L e com as duas cepas *Candida pelliculosa* – CCT 7734 e *Saccharomyces cerevisiae* YB 2293. Para tanto, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio, composto de 50 g/L de glicose, 2,5 g/L de extrato de levedura, 0,25 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ e 0,025 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ALFANI *et al.*, 2000), diluídos em água deionizada, e 5,0 mL do inóculo (10% v/v). O pH do meio foi ajustado para 5,5, previamente à esterilização. Os ensaios foram conduzidos em incubadora de agitação orbital a 28°C e 100 rpm por 72 h, sendo que após este período foram realizadas análises de crescimento celular (peso seco), pH do cultivo e produção de etanol.

3.2.16 Produção de etanol com o hidrolisado enzimático de EFB_t

O hidrolisado rico em glicose obtido da sacarificação de EFB foi utilizado como única fonte de carbono para produção de etanol, que foi realizada utilizando a

cepa escolhida na etapa anterior (*Candida pelliculosa* – CCT 7734). As etapas: de conservação das cepas, condições de crescimento e pré-inóculo foram realizadas conforme o item 3.2.15.

A diluição do hidrolisado para a concentração final de 50 g/L de glicose foi realizada com a adição de uma solução concentrada dos demais suplementos: 2,5 g/L de extrato de levedura, 0,25 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ e 0,025 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ALFANI *et al.*, 2000), diluídos em água deionizada. Ambas as soluções tiveram o pH ajustado para 5,5 previamente à esterilização e misturadas assepticamente. A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio e 5,0 mL do inóculo. Os ensaios foram realizados em incubadora de agitação orbital a 28°C e 100 rpm por 96 h, sendo que a cada 24 h ocorria o monitoramento do crescimento celular (massa seca), pH do cultivo, e produção de etanol.

3.2.17 Determinação dos parâmetros fermentativos

Foram realizadas análises dos parâmetros fermentativos massa seca e produção de etanol nas fermentações com o substrato sintético e com o hidrolisado proveniente do tratamento enzimático.

Para a determinação da massa seca, um volume conhecido de suspensão de células foi transferida para tubos Falcon, previamente tarados, centrifugada à 4.500 rpm por 10 min e seca até massa constante.

A massa seca foi determinada então, por diferença de massa, os resultados foram expressos em termos de gramas de células secas/100mL de suspensão (% m/v).

O sobrenadante foi analisado quanto à produção de etanol por CLAE como no item 3.2.7.

A eficiência da fermentação foi calculada pela Equação 8 (KASSIM *et al.*, 2011):

$$\text{Eficiência da fermentação \%} = \frac{\text{Etanol } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)}{\text{Glicose } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) \times 0,51} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

4.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PRÉVIA DOS SUBSTRATOS

4.1.1 Preparação dos cachos de frutos vazios (*Empty Fruit Brunch* – EFBs)

Antes de iniciar o pré-tratamento (ácido/básico), os EFBs foram secos e moídos. O material que chegou ao laboratório, proveniente da unidade de processamento Biopalma (Vale/Pará), passou por uma etapa de secagem na indústria. Uma nova secagem do material foi realizada após o recebimento, previamente à moagem, com o objetivo de minimizar a proliferação de micro-organismos que pudessem degradar o material. A moagem busca a redução do tamanho das partículas, o aumento da área superficial e da acessibilidade do substrato aos processos de hidrólise (ALVIRA *et al.*, 2010).

Os EFBs moídos foram separados (item 3.2.1) em peneiras de separação para garantir a homogeneidade dos tamanhos das partículas nos demais experimentos. A fração escolhida da biomassa para dar início ao pré-tratamento foi a de 0,35-0,85 mm. Esta escolha foi baseada na literatura que recomenda a faixa de tamanho de partícula inicial de 0,5 a 1 mm (SHAHRIARINOUR *et al.*, 2011; HAMZAH, IDRIS e SHUAN, 2011; HASSAN *et al.*, 2013).

Um estudo com diferentes partículas de EFB (>0,4; 0,3-0,4;<0,3 mm) mostrou que o tamanho >0,4 mm propiciou um melhor rendimento de xilose independente do tratamento químico (branqueamento ou tratamento alcalino) de EFBs pré-hidrolisados com H₂SO₄ (AZIZ *et al.*, 2002).

Yeh, Huang e Chen (2010) avaliaram a interferência do tamanho da partícula de celulose microcristalina de algodão na hidrólise enzimática. Quando o tamanho da partícula (25,5 µm) foi reduzido para 0,8 µm, o rendimento de glicose foi aumentado de 50% para 90%. Os dados demonstraram que a moagem é um método que possibilita o aumento do rendimento da hidrólise enzimática de celulose, pois suscetibiliza o material à ação enzimática.

4.1.2 Caracterização química e morfológica dos EFBs

Após a moagem e separação, os EFBs foram caracterizados por meio da metodologia citada no item 3.2.2. Os resultados obtidos para os teores de umidade, cinzas, celulose, hemicelulose e lignina, encontrados, são apresentados na TABELA 15, onde também é possível compará-los com alguns dados de caracterização de EFB já relatados por outros autores.

TABELA 15 - COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EFBs SEM TRATAMENTO PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIÕES

COMPONENTE DE EFB	CELULOSE %	HEMICELULOSE %	LIGNINA %	CINZAS %	UMIDADE %	REFERÊNCIA/ PAÍS DE PROCEDÊNCIA DO RESÍDUO
	44,3	30,1	13,5*	2,1	7,2	Este trabalho/Brasil
	43,8	35,0	16,4	-	-	HAMZAH, IDRIS e SHUAN, 2011/Malásia
	46,0	30,4	20,0*	3,6	-	RASHID <i>et al.</i> , 2011/Malásia
	39,8	17,3	28,8*	-	-	KIM e KIM 2013/Malásia
	36,1	22,4	26,4*	2,9	11,0	HASSAN <i>et al.</i> , 2013/Malásia
	41,2	-	28,4*	5,4	-	Purwandari <i>et al.</i> , 2013/ Indonésia

*Representa o valor da lignina insolúvel

Analisando a primeira linha da TABELA 15 nota-se que a soma dos componentes atingiu cerca de 97,2%. Isso se deve ao fato de que alguns compostos tais como ácidos urônicos e compostos inibidores não foram quantificados.

Os valores obtidos nesta análise estão, de um modo geral, dentro da faixa de valores encontrados na literatura. A variação da composição se deve a fatores climáticos como temperatura e umidade, relevo e constituição do solo e tipos de plantios e colheitas (ABDULLAH, NAZIR e WAHJOEDI, 2011), além de fatores

técnicos como diferentes metodologias utilizadas para a caracterização. Não foi encontrado outro trabalho que apresentasse a composição de EFBs produzidos no Brasil para fins comparativos.

Por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível visualizar a estrutura rígida e ordenada dos EFBs, além da constatação de corpos de sílica na superfície do resíduo lignocelulósico cru.

Nas FIGURAS 16 a 19 onde se pode visualizar o EFB sem tratamentos químicos, observa-se a superfície rígida coberta por uma camada de material formado por ceras ou de lignina, como descrito na literatura. Esta camada pode ser uma cutícula ou camada de proteção para evitar a perda de água nos vegetais, que após tratamento com vapor em EFB foi retirada da superfície tornando-a mais clara e sendo então possível observar os corpos de sílica (SHAMSUDIN *et al.*, 2012).

A presença de sílica na superfície de EFBs também foi comprovada por outros autores (GHAZALI, WAN ROSLI e LAW, 2009; HASSAN *et al.*, 2013; HAMZAH, IDRIS e SHUAN., 2011).

Os dados obtidos a partir desta caracterização foram utilizados para acompanhar as modificações do resíduo ao longo do pré-tratamento ácido/básico, tanto na composição química dos principais componentes presentes no EFB, bem como avaliar as modificações estruturais da fibra.

Com estes resultados foi possível concluir que a composição química dos EFBs provenientes da indústria Biopalma, após o processo de extração de óleo de palma para produção de biodiesel no Brasil, está de acordo com a composição do resíduo em diferentes partes do mundo. E ainda, por possuir composição lignocelulósica, principalmente celulose, pode ser submetido à tratamentos para a produção de bioetanol de segunda geração (SUN e CHENG, 2002; JØRGENSEN, KRISTENSEN e FELBY, 2007). O bioetanol de segunda geração de EFB é recomendado como um combustível renovável, pois não compete com a indústria de alimentos por matéria-prima, além de evitar sérios impactos ambientais (TAN, LEE e MOHAMED, 2010).

FIGURA 16 - ESTRUTURA SUPERFICIAL DA FIBRA DE EFB ANTES DO PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO. AUMENTO DE 140X

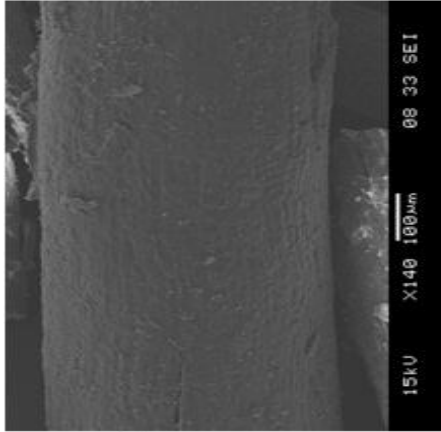


FIGURA 17 - ESTRUTURA SUPERFICIAL DA FIBRA DE EFB ANTES DO PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO. DETALHE PARA A SUPERFÍCIE ÍNTEGRA, AUMENTO DE 500X

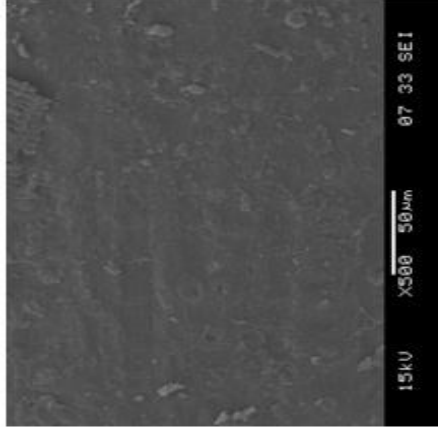


FIGURA 18 - ESTRUTURA SUPERFICIAL DA FIBRA DE EFB ANTES DO PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO. DETALHE DA SUPERFÍCIE ÍNTEGRA E COM POUCOS POROS COBERTOS COM SILICA (DESTACADOS COM CÍRCULO). AUMENTO DE 500X COM CONTRASTE

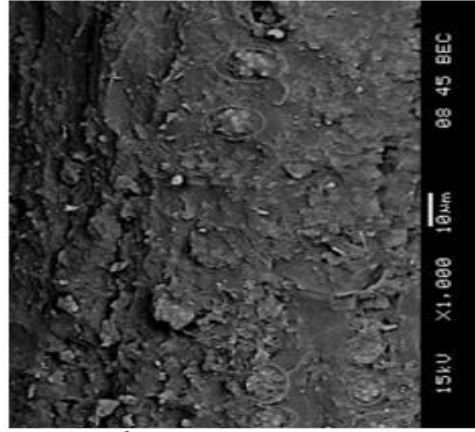
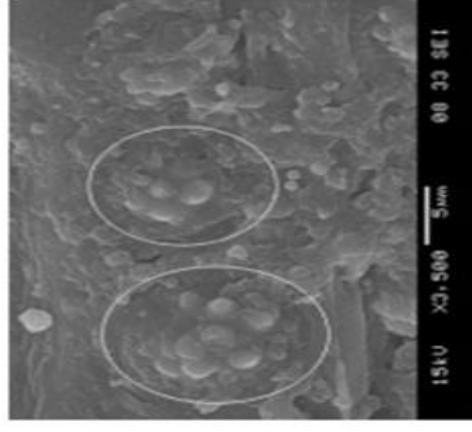


FIGURA 19 - ESTRUTURA SUPERFICIAL DA FIBRA DE EFB ANTES DO PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO. AUMENTO DA IMAGEM COM DESTAQUE NOS POROS COBERTOS COM SILICA. AUMENTO DE 3.500X



4.1.2 Caracterização do substrato Avicel

O substrato sintético Avicel® PH-101 (Fluka, Sigma-Aldrich), o qual foi empregado para fins de comparação como substrato teste, foi utilizado puro na etapa de hidrólise enzimática. Por se tratar de uma celulose microcristalina pura, não necessitou de pré-tratamento. A média de tamanho de partícula deste substrato é de aproximadamente 50 μm .

Nas FIGURAS 20 e 21 obtidas da análise por microscopia eletrônica de varredura observa-se a estrutura do Avicel. Como não se trata de um substrato lignocelulósico, este não apresenta as mesmas características visíveis nos resíduos lignocelulósicos, como por exemplo a estrutura compacta com poros na superfície.

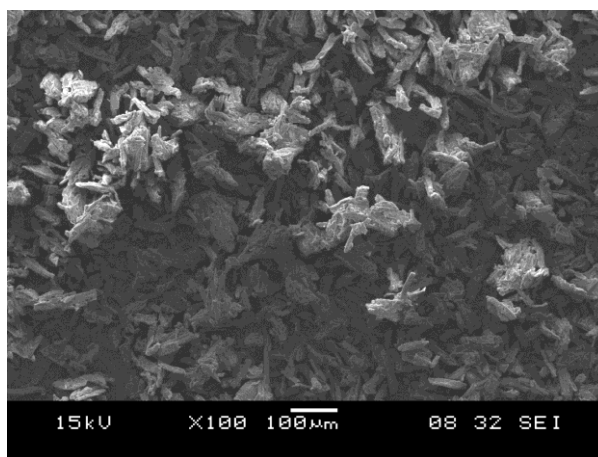


FIGURA 16 - ESTRUTURA SUPERFICIAL DO SUBSTRATO AVICEL NO AUMENTO DE 100X

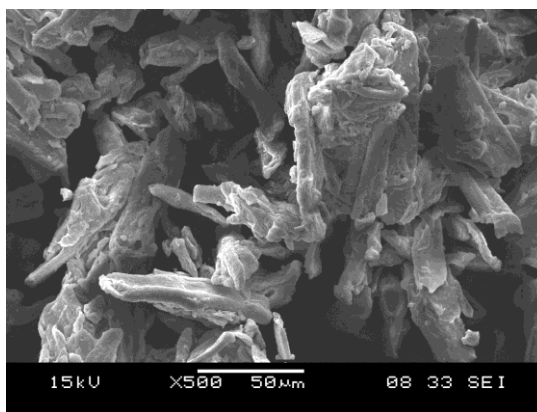


FIGURA 17 - ESTRUTURA SUPERFICIAL DO SUBSTRATO AVICEL NO AUMENTO DE 500X

4.2 PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO-BÁSICO

O pré-tratamento dos EFBs foi realizado com intuito de melhorar a acessibilidade das enzimas à celulose e, uma vez que a celulose é o principal alvo para bons rendimentos de hidrólise enzimática e, subsequente, produção de bioetanol. As pentoses e a lignina, que são solubilizadas, estão sendo estudadas em outro subprojeto do Projeto global BIOPAL dentro da biorrefinaria integrada, o qual é voltado ao pré-tratamento físico-químico do EFB. .

O pré-tratamento prévio da biomassa lignocelulósica é fundamental, pois a composição e proporção dos elementos constituintes estruturais dos resíduos lignocelulósicos afeta diretamente o rendimento da sacarificação enzimática. Tal fato foi constatado por Mussato e colaboradores (2008) utilizando bagaço de malte. Alguns fatores específicos da composição e estrutura da biomassa influenciam a hidrólise e bioconversão da celulose, dentre eles destacam-se: área de superfície, grau de cristalinidade, grau de polarização, celulose revestida por hemicelulose e, também, presença de lignina e grupos acetil (MOOD *et al.*, 2013).

Assim, inicialmente foi realizada a remoção da hemicelulose com HCl, e depois a solubilização da lignina com NaOH sob ação de temperatura e pressão, como detalhado no item 3.2.5 e 3.2.6 respectivamente. Todas as etapas do pré-tratamento foram acompanhadas pela amostragem das diferentes etapas e análises de caracterização e composição química (3.2.2), MEV (3.2.3) e EDS (3.2.4) para verificar as modificações estruturais sofridas e detecção de estruturas identificadas visualmente como sílica presente na fibra.

4.2.1 Composição do EFB após pré-tratamento ácido-básico

Os resultados da composição química dos principais componentes da biomassa, e a solubilização dos componentes após o tratamento ácido-básico podem ser vistos na TABELA 16 e 17, respectivamente.

Na TABELA 16 é possível observar uma grande faixa de composições após diferentes tipos de pré-tratamento. Os resultados podem sofrer variações devido às diferentes metodologias utilizadas para fazer a caracterização. Os diferentes pré-tratamentos influenciam a composição final dos resíduos, e principalmente a hidrólise enzimática (MOOD *et al.*, 2013). Nesta tabela, o valor obtido para a composição de celulose final (62,7%) está dentro da faixa encontrada na literatura (34,4-77,3%), após os diferentes tipos de pré-tratamento. O resultado mais próximo (66,8%), foi obtido por Hamzah, Idris e Shuan (2011), utilizando como pré-tratamento a metodologia de *Liquid Hot Water*, seguida de polpação química com NaOH e branqueamento com hipoclorito de sódio. Estes autores também relataram que a solubilização da hemicelulose e da lignina foram de 30 e 56%, respectivamente.

TABELA 16 - COMPOSIÇÃO DE EFBs APÓS TRATAMENTO ÁCIDO-BÁSICO

COMPONENTE/ TIPO DE PRÉ- TRATAMENTO	CELULOSE (%)	HEMICELULOSE (%)	LIGNINA (%)	CINZAS (%)	UMIDADE (%)	REFERÊNCIA (%)
EFB antes	44,8	30,1	13,5	2,1	7,2	Este trabalho
Após pré - tratamento HCl- NaOH	62,7	4,1	25,2	0,6	7,6	Este trabalho
Explosão à vapor + 0,5% Ác. acético	34,4	16,0	30,5*	2,4	12,4	HASSAN <i>et al.</i> , 2013
Trat básico	57,3	22,4	15,6*	4,8	-	RASHID <i>et al.</i> , 2011
Trat 1% NaOH +0,7% H ₂ SO ₄	54,2	29,1	15,1*	2,9	-	KASSIM <i>et al.</i> , 2011
LHW + NaOH	66,8	24,5	7,3	-	-	HAMZAH, IDRIS e SHUAN , 2011
Autoclave: 4% H ₂ SO ₄ - 10 mol/L NaOH	77,3	3,5	9,1	-	-	KIM <i>et al.</i> , 2012

* Expressa os valores de lignina insolúvel em ácido

Na TABELA 16 também é possível observar que a quantidade de lignina aumentou em relação ao conteúdo inicial. Este fato pode ser justificado pela TABELA 17, a qual traz as perdas em massa do resíduo após o pré-tratamento.

Houve uma solubilização de 70% em massa total que continha estes três componentes (celulose, hemicelulose e lignina), e este fato fez com que a quantidade relativa dos componentes fossem alterados considerando um mesmo tamanho de amostra do substrato não tratado. Portanto, o valor em porcentagem de lignina “aumentou”, mas não representa um aumento verdadeiro em massa 15 e 7% antes e depois do pré-tratamento respectivamente. Este aumento se refere somente em % em relação ao total, onde já houve a solubilização de outros componentes.

O processo de pré-tratamento ácido-básico demonstrou bons resultados para a sacarificação de EFB e também para remoção de lignina e hemicelulose (AZIZ *et al.*, 2002). Para estes autores, o EFB pré-tratado com 0,7% (m/v) de H_2SO_4 seguido de NaOH 2% (m/v) mostrou ser o melhor pré-tratamento para o rendimento final de açúcares após sacarificação enzimática (73,2 g/L e 51,3% de rendimento). No trabalho de Kim e Kim (2013) a taxa de deslignificação chegou a aproximadamente 68%, iniciando o pré-tratamento com 4% de H_2SO_4 seguido de NaOH 10N, sendo que, a remoção da hemicelulose foi de 82% na primeira etapa do tratamento. Por meio desta metodologia foi obtido um EFB com maior concentração de celulose, tais resultados podem ser explicados devido às altas concentrações utilizadas dos reagentes em comparação com as usadas neste trabalho.

Na TABELA 17 estão apresentados as perdas de massa após o processo de pré-tratamento ácido-básico da biomassa.

TABELA 17 - ANÁLISE DE REDUÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DE EFB EM CADA ETAPA DO PRÉ-TRATAMENTO

COMPONENTE	EFB CRU	EFB APÓS TRATAMENTO ÁCIDO-BÁSICO	PERDA DE MASSA TOTAL** (%)
Celulose (g)*	49,2	19,1	61,2
Hemicelulose (g)*	33,4	1,2	96,3
Lignina (g)*	15,0	7,7	49,0
Cinzas (g)*	2,3	0,2	91,9
Total de EFB (g)	100,0	28,3	71,7

*A composição foi normatizada em relação à umidade

**Em relação ao EFB Cru

Após o tratamento ácido-básico, a hemicelulose foi claramente o componente do EFB que mais foi afetado, com solubilização de 96%, seguido da celulose com 61,2% e da lignina com 49% (TABELA 17). O pré-tratamento proposto foi capaz de solubilizar no final um total de 70% em massa de EFB, sendo que a composição final indica que a massa de EFB restante contém um total de 62,7%, ou seja, 19,1 g de celulose, que será posteriormente degradada pelas enzimas na próxima etapa de hidrólise enzimática.

Segundo Wyman e colaboradores (2005) a remoção da lignina é um fator importante na efetividade do pré-tratamento, a qual representa uma barreira à acessibilidade das celulasas ao substrato (TAHERZADEH e KARIMI, 2008; MOOD *et al.*, 2013; ALVIRA *et al.*, 2010). Este estudo apresenta ainda uma porcentagem de lignina (25,2%) acima de outros valores encontrados como, 7,3 e 9,1%, entretanto a quantidade de celulose disponível se assemelha à estes autores cujos pré-tratamentos foram mais eficientes na remoção da lignina.

Os resultados da auto-hidrólise de EFB que foi conduzida por Shamsudin e colaboradores (2012), utilizando como substrato o EFB obtido após esterilização prévia na indústria para facilitar a retirada do óleo dos frutos, mostrou que a composição mudou, sendo que houve um aumento de 18% de celulose, 16% e 10% de redução de hemicelulose e lignina, respectivamente. Os baixos rendimentos de hemicelulose e lignina neste trabalho podem ser explicados pela ausência de ácido e base, respectivamente, que poderiam solubilizar uma fração maior durante o tratamento.

Han e colaboradores (2011) realizaram otimização do pré-tratamento de EFB com NaOH (72-207°C, tempo de 5-55 min e concentração de NaOH 0,3-4% mol/L). A variável resposta levou em consideração a hidrólise enzimática realizada após o pré-tratamento, indicando que a concentração de NaOH é o fator dominante que afeta a hidrólise enzimática. A severidade do pré-tratamento resultou em uma diminuição da quantidade de glicose absoluta. Este fato também foi observado na TABELA 17.

Na TABELA 17 também observa-se que a perda de massa de EFB após o pré-tratamento ácido básico foi cerca de 70%. A perda de massa no tratamento de EFB também foi observada por Aziz e colaboradores (2002). Nas faixas de 0,5 e 2% de NaOH, a perda de massa aumentou de 45% para 63%, respectivamente, em 120 minutos de tratamento em autoclave (121°C). Os autores concluíram que a perda de

peso está relacionada com a retirada da lignina, que aumentou ao longo do tempo de pré-tratamento (30-120 min) e a concentração de base (0,5-2% m/v). No trabalho de Kim e Kim (2013), citado anteriormente, a perda de massa com o pré-tratamento chegou a 74%.

Uma vez que a recuperação das pentoses é uma etapa importante no esquema global de uma biorrefinaria, a proposta de pré-tratamento deste trabalho é interessante, pois recupera cerca de 56,6% destes açúcares na primeira etapa do pré-tratamento, que consiste na hidrólise ácida com 2,5% de HCl. O xarope obtido, composto por xilose, pode ser utilizado, por exemplo, na fabricação de xilitol e ácido láctico (SAHA, 2003). Este tipo de comportamento já era esperado, uma vez que o pré-tratamento com ácido diluído visa, principalmente, a solubilização e remoção seletiva da fração hemicelulósica contida em materiais lignocelulósicos (GÍRIO *et al.*, 2010; TAHERZADEH e KARIMI, 2008).

4.2.2 Análise morfológica do EFB após etapa do pré-tratamento ácido básico

A FIGURA 22 mostra as micrografias das etapas de pré-tratamento ácido-básico. A olho nu, é possível observar apenas diferenças superficiais e qualitativas nos resíduos, tais como a diminuição do volume e diferença na coloração do material.

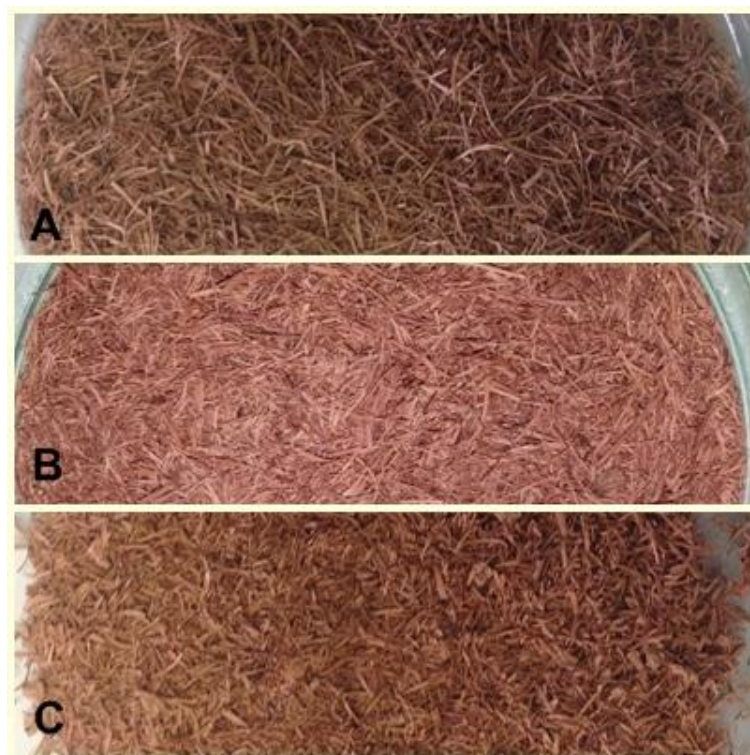


FIGURA 18 - DIFERENÇAS APRESENTADAS NOS EFBs ANTES DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO - **A**, DEPOIS DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO - **B**, E APÓS PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO-BÁSICO – **C**

Com a microscopia eletrônica de varredura (MEV) é possível confirmar a efetividade do pré-tratamento, quando ambos, lignina e hemicelulose, foram removidos após ação termo-química. A estrutura do material mostrou grande alteração, deixando a celulose exposta, e muito mais susceptível à hidrólise enzimática. Os corpos de sílica presentes nos poros da superfície do resíduo também foram eliminados com o pré-tratamento, favorecendo também a atividade enzimática.

Nas FIGURAS 16 e 17 foi visto o EFB sem tratamentos químicos, observa-se a superfície rígida coberta por uma camada de material formado por ceras ou de lignina. Esta camada pode ser uma cutícula ou camada de proteção que evita a perda de água nos vegetais (SHAMSUDIN *et al.*, 2012). Após o tratamento ácido (FIGURA 23 e 24) pode-se observar uma maior quantidade de corpos de sílica na superfície, isso porque a camada que recobria as fibras parece ter sido removida com o pré-tratamento ácido. Entretanto, estes só foram efetivamente removidos após o tratamento básico (FIGURA 25 e 26). Além disso, nestas análises morfológicas é possível observar as mudanças na estrutura após o pré-tratamento ácido-básico facilitando o acesso das enzimas à celulose.

FIGURA 23 - FIBRA DE EFB APÓS
PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO,
AUMENTO DE 140X

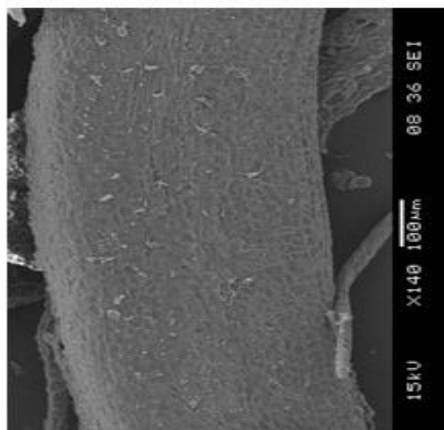


FIGURA 24- ESTRUTURA SUPERFICIAL
DA FIBRA DE EFB APÓS
PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO,
INDICANDO OS POROS COM SILICA,
AUMENTO DE 500X

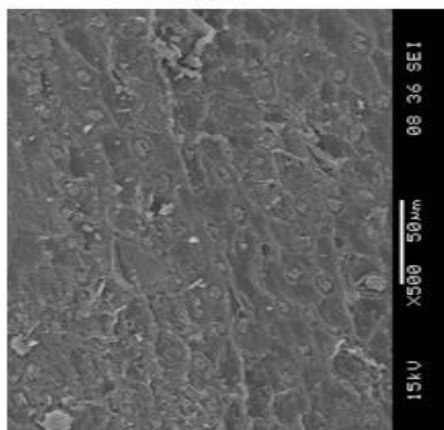


FIGURA 25 - ESTRUTURA SUPERFICIAL
DA FIBRA DE EFB APÓS
PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO-BÁSICO,
AUMENTO DE 140X

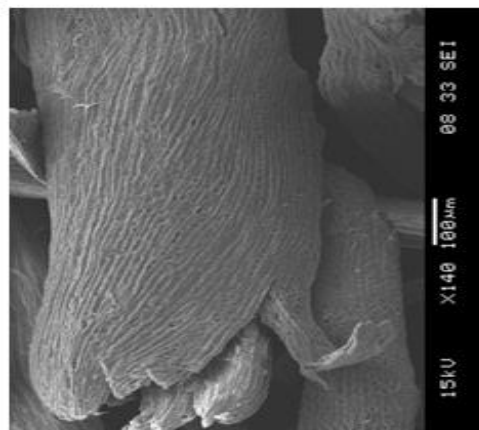
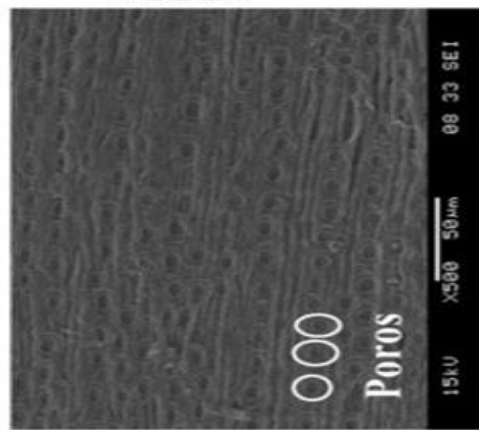


FIGURA 26 - ESTRUTURA SUPERFICIAL
DA FIBRA DE EFB APÓS
PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO-BÁSICO,
INDICANDO OS POROS
LIVRES DE SILICA, AUMENTO DE 500X



A presença de sílica em EFBs, e a sua remoção após alguns tipos de pré-tratamento é encontrada na literatura.

Corpos de sílica foram encontrados em grande número nas fibras de EFB, em conjunto com crateras circulares, estando espalhados de maneira relativamente uniforme sobre a superfície da fibra (LAW, DAUD, & GHAZALI, 2007).

Hamzah, Idris e Shuan (2011), a partir de micrografias da fibra de EFB, concluíram que o pré-tratamento aplicado também foi capaz de desfazer a estrutura rígida e ordenada observada no resíduo sem tratamento. Além disso, a sílica presente nas cavidades foi removida na proporção de 7% para 0,9%, a depender do aumento da superfície de contato.

As mudanças estruturais de EFB, após pré-tratamentos com fungos e ácido fosfórico, foram confirmados por análises de FTIR e MEV. Os resultados em MEV mostraram que as estruturas das fibras dos EFBs foram completamente danificadas após o tratamento, além de demonstrarem que a sílica também foi removida da superfície (ISROI *et al.*, 2012). Shamsudin e colaboradores (2012) também encontraram sílica na superfície de EFB e observaram que, após tratamento com vapor, os corpos de sílica foram desalojados dos poros.

Dados obtidos com MEV e EDAX (*Energy Dispersive X-ray Analysis*), após tratamento com DTPA (*diethylenediaminepentaacetic acid*) e moagem, mostraram que 86% de sílica foi eliminada. Tal fato permitiu uma polpação química mais branda com o uso de peróxido na biomassa de EFB (GHAZALI, WAN ROSLI e LAW, 2009).

Mussatto e colaboradores (2008) observaram mudanças na estrutura por meio de MEV do bagaço de malte de cevada após tratamentos com ácido sulfúrico diluído e hidróxido de sódio. Estes solubilizaram as frações de hemicelulose e lignina presentes no resíduo. O material sem tratamento apresentou fibras compactas e altamente ordenadas, enquanto que, após o pré-tratamento, a fibra estava mais exposta, aumentando assim a área superficial e a sua porosidade.

Os dados da avaliação por EDS demonstram a composição do elemento Si (silício) nos EFBs em cada etapa de pré-tratamento. Após o final do pré-tratamento, 99,8% do Si foram retirados das fibras dos EFBs. Para estimar a quantidade de sílica nas amostras, levou-se em consideração a presença do Si. O resultado foi confirmado por meio da MEV que mostrou as diferenças encontradas na superfície antes e depois do tratamento químico. A concentração deste componente que no

EFB cru era de 0,5% chega a 0,01% após o tratamento ácido-básico, uma redução de quase 100%.

4.3 LAVAGENS SUCESSIVAS DA FIBRA DE EFBS APÓS TRATAMENTO QUÍMICO

A biomassa de EFB passou por lavagens sucessivas após o pré-tratamento básico, previamente à hidrólise enzimática. As lavagens foram feitas de acordo com a metodologia 3.2.6 (EFB pré-tratado+água deionizada) e repetidas até que o pH chegasse a 7. A cada nova lavagem uma amostra foi guardada para análises da concentração dos compostos fenólicos presentes e também da atividade da enzima Cellic CTec2. O objetivo deste experimento foi eliminar compostos fenólicos, que supostamente poderiam estar impregnados na estrutura da fibra de EFB, impedindo a ação enzimática, e caracterizar o “resíduo” líquido das lavagens. A FIGURA 27 mostra visualmente as águas de lavagens retiradas após cada etapa de lavagem.

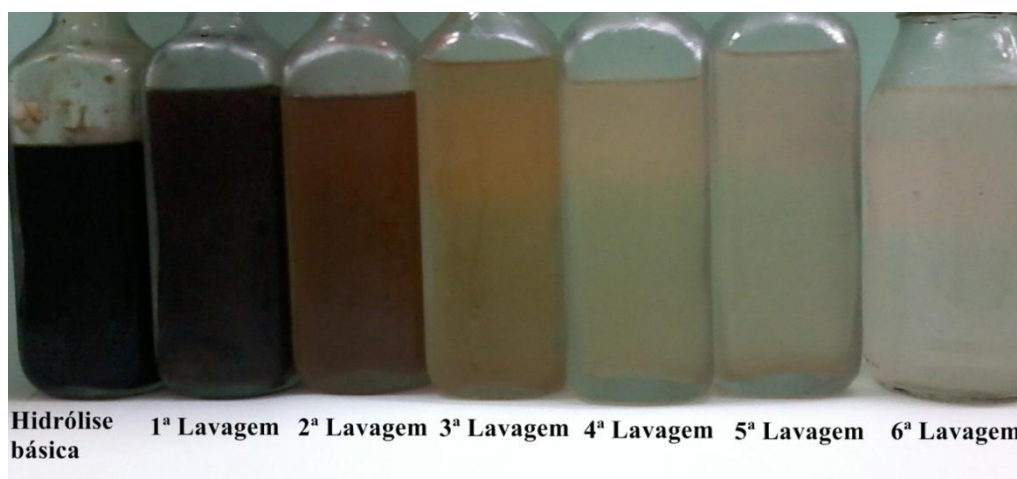


FIGURA 19 - COLORAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA OBTIDAS APÓS CADA ETAPA DE LAVAGEM DOS EFBS PRÉ-TRATADOS TERMOQUIMICAMENTE

4.3.1 ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NAS LAVAGENS

O processo de produção de polpa celulósica, requer a deslignificação com hidróxido de sódio sob pressão. Esta reação resulta em uma celulose mais pura e o resíduo líquido conhecido como “licor negro”, que contém a lignina e outros compostos fenólicos (SUN e TOMKINSON, 2001). Estes compostos fenólicos são interferentes da atividade enzimática (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Como pode ser observado na FIGURA 27 a coloração das amostras diminuiu após cada lavagem, e pela FIGURA 28 comprovamos que a diminuição da cor é acompanhada da diminuição da concentração dos compostos fenólicos. Na primeira filtragem denominada H (resíduo da hidrólise básica) a concentração era de 3,3 mg/mL de compostos fenólicos e com as lavagens diminuiu para 0,01 mg/mL na sexta e última etapa, chegando a quase 100% de remoção destes compostos.

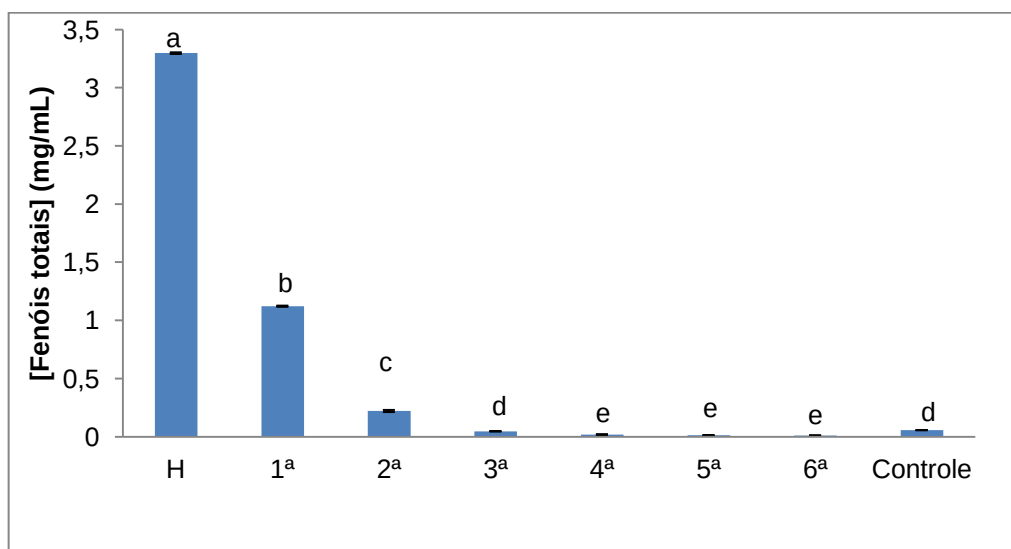


FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM CADA AMOSTRA RETIRADA DAS LAVAGENS SUCESSIVAS NAS FIBRAS DE EFB APÓS O TRATAMENTO ALCALINO

* Letras diferentes= apresentam diferença significativa ($p < 0,05$)

Letras iguais= não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$)

A amostra utilizada no controle, a qual foi preparada com uma suspensão de EFB seco após hidrólise ácida e água deionizada (10% m/v), apresenta aproximadamente 0,06 mg/mL de compostos fenólicos. Estes compostos provavelmente são resíduos do tratamento ácido e permaneceram nas fibras após

este tratamento. A concentração de compostos fenólicos presentes na primeira filtração (resíduo da hidrólise básica), mostrou que estes não estavam presentes na amostra (EFB após pré-tratamento ácido), e sim do tratamento alcalino.

Quando comparado com o controle, que continha 0,06 mg/mL de compostos fenólicos, as amostras H, 1^a, 2^a, 4^a, 5^a e 6^a lavagens foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), apresentando resultados inferiores 3,3; 1,2; 0,23; 0,02; 0,01 e 0,01 mg/mL de compostos fenólicos, respectivamente. Já a amostra da 3^a lavagem, não apresentou diferença (0,05 mg/mL). Antes da 3^a lavagem, as amostras apresentaram concentrações de compostos fenólicos maiores do que o controle ($> 0,06$ mg/mL), na 3^a lavagem passou a ser igual ($= 0,06$ mg/mL), e depois passaram a ser menores ($< 0,06$ mg/mL). Este fato deve-se à quantidade de fenólicos começar a diminuir nas primeiras lavagens (1^a e 2^a) e acabar ficando semelhante ao controle exatamente na 3^a lavagem, pois o controle, como dito anteriormente, continha uma pequena quantidade de compostos fenólicos residuais. Nas próximas lavagens (4^a, 5^a e 6^a), a concentração de compostos fenólicos continuou a diminuir ficando menor que o controle, o que mostra que as lavagens foram importantes para retirar os compostos da fibra de EFB.

A concentração de compostos fenólicos das lavagens, 4-5-6 não são estatisticamente diferentes entre si (0,02; 0,01 e 0,01 mg/mL, respectivamente), mas diferem das demais H, 1^a, 2^a e controle (3,3; 1,2; 0,23 e 0,06 mg/mL, respectivamente).

4.3.2 Determinação da atividade enzimática da enzima Cellic CTec2 na presença das amostras das águas de lavagem

A determinação da atividade enzimática da enzima Cellic CTec2 na presença das águas de lavagem foram realizadas com a substituição do tampão citrato pelo mesmo volume de amostra de água de lavagem, conforme a metodologia original de determinação de atividade celulolítica (GHOSE, 1987) utilizando o PF como substrato. No controle foi utilizada água deionizada, pois foi empregada nas

lavagens. Na FIGURA 29 é possível observar o aumento da atividade enzimática da enzima Cellic Ctec2 conforme as etapas de lavagens.

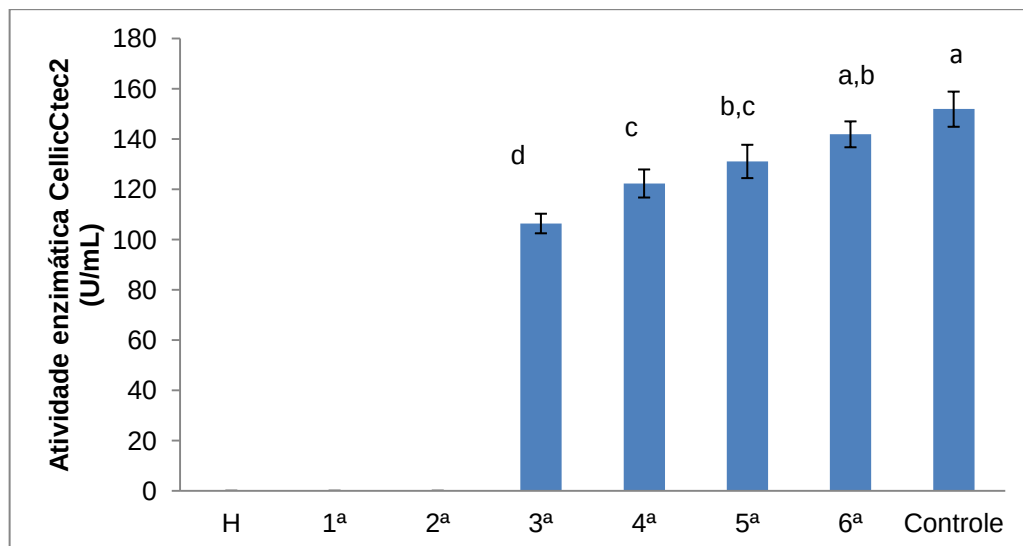


FIGURA 21 - ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA ENZIMA CELLIC CTEC2 EM AMOSTRAS RETIRADAS DE LAVAGENS SUCESSIVAS DAS FIBRAS DE EFB APÓS O TRATAMENTO ALCALINO

* Letras diferentes= apresentam diferença significativa ($p < 0,05$)

Letras iguais= não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$)

As atividades enzimáticas das amostras provenientes diretamente da hidrólise (H) e após a 1ª e 2ª lavagem, não apresentaram atividades enzimáticas (FIGURA 29). Este fato pode ser explicado após uma análise da FIGURA 28, na qual foi constatada a presença de maiores concentrações de compostos fenólicos nestas amostras (3,3-0,23 mg/mL), as quais podem ter inibido a ação da enzima Cellic Ctec2.

A atividade enzimática da enzima Cellic Ctec2 aumentou de 106,4 para 141,9 FPU/mL cerca de 40 unidades com as sucessivas lavagens, da 3ª para a 6ª respectivamente, e consequente acompanha pela diminuição da concentração de compostos fenólicos.

Com exceção da 6ª lavagem (141 FPU/mL), todas as outras lavagens (3ª, 4ª e 5ª – 106,4; 122,3 e 131,1 FPU/mL) foram diferentes significativamente ($p < 0,05$) do controle que apresentou atividade de 151,9 FPU/mL. Sendo a atividade enzimática da enzima Cellic Ctec2 estatisticamente semelhante à atividade enzimática

controle, pode-se concluir que realizar 6 lavagens sucessivas seria o ideal para que a enzima conseguisse atingir sua atividade máxima, com pH igual a 7 e praticamente livre de compostos fenólicos, ou seja, em condições semelhantes às do controle.

Uma vez que o solvente das lavagens é água deionizada, a qual é 100% livre de compostos fenólicos, a comparação com o controle mostra que foi possível chegar ao melhor resultado, não havendo necessidades de mais lavagens. Para chegar à atividade máxima prevista pelo protocolo (GHOSE, 1987), o pH do meio teria que ser mais baixo, em torno de 4,8, o que seria impossível de realizar somente fazendo as lavagens com água. O pH das amostras não foi ajustado para este valor devido à lignina ser insolúvel em pHs abaixo de 7 (SUN e TOMKINSON, 2001). Assim, os compostos fenólicos iriam precipitar e não seria possível quantificá-los.

Entre a 5ª e a 6ª lavagem não houve diferença significativa de atividade enzimática entre as lavagens, apesar da concentração de compostos fenólicos ser a mesma nestas amostras. Este resultado pode ser explicado pela diferença de pH entre os tratamentos (TABELA 18), sendo pH 8,5 na 5ª e pH 7,0 na 6ª lavagem, que influencia o comportamento da enzima.

Com a análise dos resultados apresentados acima, é possível concluir que até em baixas concentrações, em torno de 0,01-0,02 mg/mL, os compostos fenólicos presentes na 5ª água de lavagem com pH 8,5 inibiram a atividade enzimática da enzima Cellic CTec2, nas condições testadas. Com 6ª lavagem que apresentou a mesma concentração de compostos fenólicos que a 5ª, entretanto com o pH=7 a diferença da atividade da enzima em comparação com o controle não foi significativa. Os compostos fenólicos já foram relatados como interferentes na sacarificação enzimática (ALMEIDA *et al.*, 2007) das celulasas em concentrações iguais a 5 mg/mL.

Um resumo das análises realizadas nas amostras de águas de lavagens do EFB após o tratamento básico é apresentado na TABELA 18.

TABELA 18 - RESUMO DAS ANÁLISES DAS ÁGUAS DE LAVAGENS DO EFB APÓS TRATAMENTO BÁSICO

	HIDRÓLISE	1 ^a LAVAGEM	2 ^a LAVAGEM	3 ^a LAVAGEM	4 ^a LAVAGEM	5 ^a LAVAGEM	6 ^a LAVAGEM	CONTROLE
Atividade enzimática Cellic Ctec2 (U/mL)	0	0	0	106,4 ± 3,90	122,3 ± 5,58	131,1 ± 6,63	141,9 ± 5,15	151,7 ± 6,99
[Compostos fenólicos] (mg/mL)	3,30 ± 0,0071	1,12 ± 0,0052	0,23 ± 0,0090	0,05 ± 0,0002	0,02 ± 0,0001	0,01 ± 0,0003	0,01 ± 0,0003	0,06 ± 0,0002
pH	14	14	13,8	11,6	10,9	8,5	7	7

Na FIGURA 30 pode-se observar que a atividade enzimática foi praticamente nula quando a concentração de compostos fenólicos eram de 3,3-0,23 mg/mL e pH de 14-13,8, sendo estes valores altos e prejudicando a atuação da enzima.

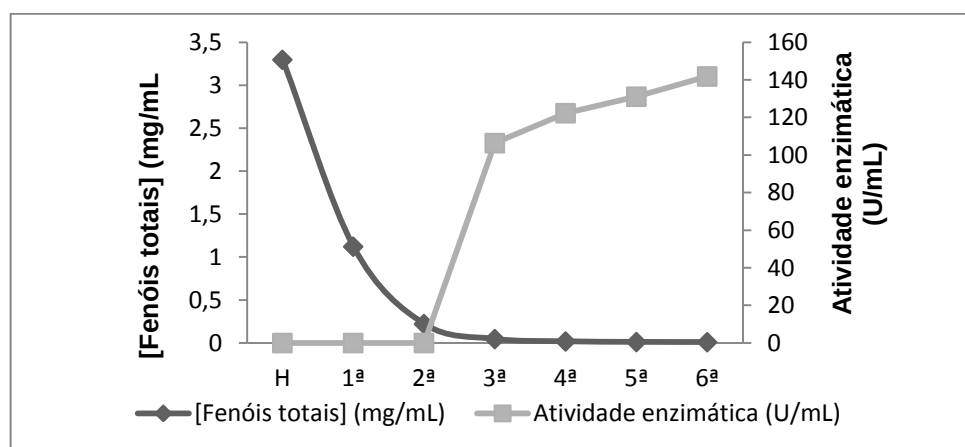


FIGURA 22 - RELAÇÃO ENTRE O AUMENTO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA CTEC2 E A DIMINUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM AMOSTRAS DE ÁGUAS DE LAVAGENS SUCESSIVAS DAS FIBRAS DE EFBs APÓS O TRATAMENTO ALCALINO

Um aumento da atividade até aproximadamente 100 U/mL ocorreu quando a concentração dos compostos fenólicos caiu para 0,05 mg/mL e o pH diminuiu para 11,6. A diminuição do pH e da concentração dos compostos fenólicos foram fatores indispensáveis para o aumento da atividade enzimática. Portanto, as lavagens são necessárias previamente à hidrólise enzimática de modo a otimizar a ação das enzimas e melhorar os seus rendimentos.

Industrialmente, as lavagens poderiam ser realizadas em um tanque de mistura com agitação. Neste caso a relação massa de EFB e água de lavagem e o tempo de agitação seriam parâmetros a serem otimizados. Tal fato propiciaria a lavagem com volumes menores de água e com maior eficiência.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS CELULASE E CELOBIASE

Antes de iniciar o estudo da aplicação das enzimas celulase e celobiase comerciais, ensaios foram realizados para a determinação das atividades enzimáticas destas: Cellic CTec2, Celluclast 1.5L e Novozymes 188. As atividades enzimáticas foram realizadas de acordo com os procedimentos 3.2.9.1 e 3.2.9.2, para FPU e CBU respectivamente, de forma a se quantificar as atividades das enzimas empregadas. Os resultados de determinação das atividades das enzimas em questão podem ser observados na TABELA 19, onde também estão dispostas as atividades descritas nos rótulos de cada enzima:

TABELA 19 - ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DAS ENZIMAS COMERCIAIS UTILIZADAS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE EFB

ENZIMA	ATIVIDADE CELULASE (GHOSE, 1987)	ATIVIDADE CELOBIASE (GHOSE, 1987)	ATIVIDADE DO FABRICANTE (NOVOZYMES®)
Cellic CTec2	187,8 FPU/mL	802,8 U/mL	NI
Celluclast 1.5L	40,3 FPU/mL	Ausente	≥700 U/g
Novozymes 188	Ausente	905,8 U/mL	≥ 250 U/g

NI = Não Informado

Existe uma grande diferença na literatura de metodologias para determinação de atividade enzimática, e uma ampla faixa de atividades encontradas para as mesmas enzimas, inclusive há diferença entre a atividade e na unidade de atividade do fabricante como visto na TABELA 19. A seguir alguns exemplos que mostram estas divergências:

- Hassan e colaboradores (2013) encontraram uma atividade de Celluclast 1.5L igual a 121,85 FPU/mL contendo 12,16 mg/mL de proteína, e de Novozymes 188 44,2 CBU/mL com total proteína 24,23 mg/mL (metodologia de Zhang 2009¹ e Ghose 1987)

- HAMZAH, IDRIS e SHUAN (2011) obtiveram 98,4 FPU/mL para a atividade enzimática da Celluclast 1,5L e 770 U/mL de atividade beta-glicosídica para Novozymes 188 (GHOSE, 1987).

- Cellic CTec2 teve atividade celulolítica determinada por Isroi e colaboradores (2012) que obtiveram 148 FPU/mL. Kim e Kim (2013) caracterizaram esta enzima com 84 FPU/mL.

- Em um estudo também com estas três enzimas LAN, LOU E ZHU (2012) encontraram atividades para Celluclast 1.5L 60 FPU/mL; CTec2 150 FPU/mL; e Novozyme 188 490 (CBU)/mL , utilizando a metodologia de Whood e Bhat (1998)².

4.5 OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS DE NATUREZA CELULÓSICA E LIGNOCELULÓSICA

Esta etapa foi realizada com o intuito de determinar as melhores condições, dentre os fatores concentração enzimática de enzimas comerciais, tempo de hidrólise e concentração de substrato, que levam a obtenção de um hidrolisado com altas concentrações de açúcares fermentescíveis (glicose). O hidrolisado obtido terá futura aplicação industrial, como por exemplo, a produção de bioetanol. Assim, foram conduzidos estudos com o suporte de planejamentos experimentais para a otimização das condições de hidrólise enzimática. Dois substratos foram empregados neste estudo: um substrato sintético de natureza celulósica (AVICEL) e um substrato lignocelulósico proveniente do processo de extração do óleo de palma,

¹ Zhang YHZ, Hong J, Ye X. **Cellulase assays**. Mielenz JR, editor. Biofuels: methods and protocols (method in molecular biology). New York: Human Press, p. 216-218, 2009.

² WOOD, T. M., BHAT, K. M. **Methods for measuring cellulase activities**. In: W. A. Wood and S. T. Kellog (eds.). Academic Press, San Diego, CA. *Methods in enzymology*, v. 160, p. 87-116, 1988.

ou seja, os cachos vazios de frutos de palma (EFBs) pré-tratados quimicamente por ácido e base, conforme estudo da seção anterior. Ainda, dois sistemas enzimáticos comerciais foram testados com ambos os substratos, na tentativa de se determinar a melhor composição de enzimas celulolíticas para futura produção de complexo enzimático a baixo custo.

4.5.1 Estudo da otimização do processo de hidrólise enzimática do substrato Avicel

Para estudar o mecanismo de ação e interação de enzimas celulolíticas em diferentes substratos, muitos substratos relativamente “puros” estão sendo usados, como por exemplo o Avicel PH101. Assim, espera-se fazer a comparação com os resultados alcançados em substratos heterogêneos. A partir destes dados pode-se observar se houve diferença na ação enzimática em substratos heterogêneos, se a presença de outros componentes no substrato influencia o mecanismo enzimático, e se há necessidade de outras enzimas multifuncionais (MANSFIELD, MOONEY e SADDLER, 1999).

4.5.1.1 Otimização das condições da hidrólise enzimática do substrato Avicel com as enzimas comerciais Celluclast 1.5L e Novozymes 188

Primeira etapa de otimização- Planejamento fatorial incompleto 2^{4-1}

Na TABELA 20 pode-se observar a matriz do planejamento experimental com os níveis decodificados de cada fator estudado, a variável resposta, bem como os respectivos rendimentos de hidrólise enzimática. As variáveis independentes neste estudo foram: concentração das enzimas Celluclast 1.5L e Novozymes 188, do substrato Avicel, e o tempo de hidrólise. Como variável dependente foram apresentados os resultados obtidos para a concentração de glicose g/L obtida no hidrolisado.

O melhor resultado para a hidrólise enzimática neste experimento, foi o do ensaio 8 apresentado na TABELA 20, 87,8 g/L, o qual foi alcançado nas condições: 4 e 0,4% (v/v) das enzimas Celluclast 1.5L e Novozymes 188, respectivamente, tempo de hidrólise de 72 horas e com 15% (m/v) de substrato Avicel. Estas condições representam os níveis mais altos de cada variável testada. O resultado menos satisfatório para a concentração de glicose foi 23 g/L relativo ao ensaio 1, onde estão presentes os níveis mais baixos do planejamento (5% de Avicel, 1% Celluclast e 0% de Novozymes 188). Assim, o ensaio 8 apresentou uma resposta cerca de 3,8 vezes maior que a do ensaio 1 (23 g/L), e 1,3 vezes maior em relação ao ponto central (média de 66 g/L entre os 3 pontos centrais). Para estas condições, a concentração máxima teórica esperada seria de 150, 100 e 50 g/L, para o ensaio 8, ponto central e ensaio 1, respectivamente.

TABELA 20 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2⁴⁻¹ COM 3 PONTOS CENTRAIS E 4 VARIÁVEIS - PRIMEIRA ETAPA DA OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO AVICEL

FATORES				RESPOSTA RENDIMENTOS			
ENSAIOS	[CELLUCLAST] (%) (v/v)	[NOVOZYMES 188] (%) (v/v)	TEMPO (h)	[AVICEL] (%) (m/v)	GLICOSE (g/L)	RENDIMENTO (%)	mg DE GLICOSE/ g DE AVICEL*
1	1	0	24	5	23,0	41,4	459,7
2	4	0	24	15	41,7	25,0	277,7
3	1	0,4	24	15	55,1	33,1	367,4
4	4	0,4	24	5	37,5	67,6	750,7
5	1	0	72	15	43,7	26,2	291,0
6	4	0	72	5	45,2	81,4	904,9
7	1	0,4	72	5	53,2	95,8	1064,3
8	4	0,4	72	15	87,8	52,7	585,6
9 (C)	2,5	0,2	48	10	63,9	57,5	639,3
10 (C)	2,5	0,2	48	10	66,6	59,9	665,7
11 (C)	2,5	0,2	48	10	67,5	60,8	675,5

*Produção de glicose/Avicel

Números em negrito representam os maiores valores de sua respectiva coluna

Com 95% de confiança, nenhum dos fatores foi significativo, por isso os resultados estatísticos apresentados neste caso foram calculados com 90% de confiança.

Os rendimentos obtidos foram maiores com uma menor concentração de sólidos (5% m/v), como vistos na TABELA 20 nos ensaios 6 e 7. Tal resultado era esperado uma vez que as enzimas conseguem degradar todo o substrato presente, chegando a quase 96% e 82% de sacarificação enzimática no ensaio 7 e 6, respectivamente.

Conforme os valores de p apresentados na TABELA 21 onde estão apresentados os parâmetros testados: tempo, concentração da enzima Novozymes 188, concentração de Avicel, foram significativos ($p < 0,1$) para a concentração final de glicose. Os efeitos destas variáveis na resposta estudada podem ser visualizados na FIGURA 32, onde é possível verificar que os fatores significativos apresentaram efeito positivo na resposta final, principalmente a concentração de Novozymes 188 e o tempo de hidrólise. A concentração de Celluclast 1.5L não foi significativa dentro da faixa estudada, talvez devido à estreita faixa testada dos níveis estudados.

TABELA 21 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE PRODUZIDA APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA UTILIZANDO: CELLUCLAST 1.5L, NOVOZYMES 188 E AVICEL – PRIMEIRA ETAPA

FATORES	SQ	GL	QM	F	P
(1)% Celluclast (v/v)	173,907	1	173,9074	1,145087	0,325727
(2)% Novozymes 188 (v/v)	803,456	1	803,4558	5,290328	0,061094*
(3)Tempo (h)	660,167	1	660,1666	4,346845	0,082175*
(4)% Avicel (m/v)	599,833	1	599,8326	3,949578	0,094060*

SQ= soma dos quadrados, GL= graus de liberdade, QM= quadrado médio
 $R^2 = 0,71$

*Valores estatisticamente significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$)

Uma maneira de avaliar os dados obtidos é por meio da análise de variância (ANOVA), representada pelo coeficiente de determinação (R^2), que mostra como os dados obtidos se ajustam ao modelo. O melhor valor para R^2 é 1, e ele só ocorrerá se não houver resíduo algum e, portanto, toda a variação em torno da média for explicada pela regressão (BARROS NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 1995). A TABELA 8, que descreve a regressão linear no planejamento em questão, mostra que o $R^2 = 0,71$ é aceitável para um planejamento estatístico.

Utilizando a enzima Celluclast 1.5L e Novozymes 188, Ouyang e colaboradores (2010), conseguiram uma conversão de 39,5% com 5% (m/v) de

Avicel PH 101 e 15 FPU/g de glucana, após 48 h de reação e somente após a adição de PEG4000 (0,05 g/g de glucana) este rendimento aumentou para 78,9%. Em 48 h os rendimentos de sacarificação enzimática observados na TABELA 20 apresentaram em média 59,4% de rendimento, entretanto, com uma maior concentração de substrato, 10% (m/v).

Os dados analisados também mostraram que, nenhum outro açúcar foi encontrado nas análises por CLAE. O uso da enzima Novozymes 188 (β -glicosidase) em conjunto com a Celluclast 1,5L foi importante para que não houvesse acúmulo de celobiose no hidrolisado. Este açúcar não foi detectado nas análises cromatográficas. Ouyang e colaboradores (2010) mostraram que a hidrólise enzimática de Avicel com Celluclast 1.5L e ausência da enzima Novozymes 188, fez com que 2,5 g/L de celobiose fosse encontrado no hidrolisado. Dados também obtidos por Hassan e colaboradores (2013) com estas duas enzimas não mostraram a presença de celobiose após sacarificação de EFB.

A celobiose é um inibidor das celulasas durante a hidrólise enzimática da celulose. Além disso, as leveduras industriais, utilizadas para a fermentação de glicose, não são capazes de assimilar a celobiose como açúcar fermentescível resultando em uma incompleta conversão do hidrolisado proveniente da celulose em etanol. Em ambos os casos há diminuição do rendimento final. Portanto, a utilização de β -glicosidases é necessária para se obter melhores rendimentos (SUN e CHENG, 2002).

No diagrama de Pareto (FIGURA 31) é possível observar que os efeitos referentes às variáveis concentração da enzima Novozymes 188, tempo de hidrólise e concentração de substrato apresentaram diferença significativa ($p < 0,1$), contudo, a concentração da enzima Celluclast não foi significativa.

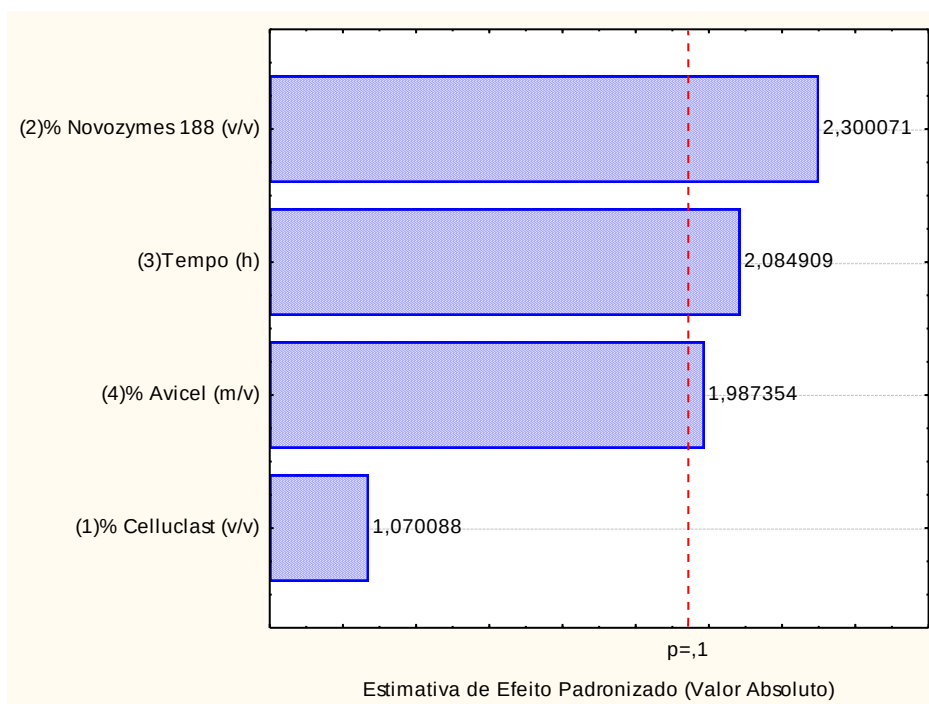


FIGURA 23 - GRÁFICO DE PARETO A PARTIR DO PLANEJAMENTO 2^{4-1} : PRIMEIRA ETAPA DA OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO AVICEL COM AS ENZIMAS CELLUCLAST 1.5L E NOVOZYMES 188

Quando há uma baixa carga inicial de biomassa a concentração final de bioprodutos é baixa, entretanto o rendimento de conversão de hidrólise da celulose em glicose é alto, pois a carga de substrato e o rendimento são grandezas inversamente proporcionais. Tal fato resulta em baixa produtividade e elevado custo de produção (IOELOVICH e MORAG, 2012). Estas informações podem ser confirmadas na TABELA 20 nos ensaios 1,4,6 e 7, onde é possível observar que com a utilização de baixas concentrações de substrato, Avicel, foi produzida uma menor quantidade de glicose no hidrolisado final. Assim, aumentando a concentração de sólidos durante a hidrólise enzimática é possível aumentar consideravelmente a concentração de açúcar, entretanto este aumento leva a uma diminuição do rendimento da hidrólise enzimática. Contudo, nosso objetivo é conseguir um hidrolisado como recomenda a literatura (IOELOVICH e MORAG, 2012), acima de 80 g/L de açúcares fermentescíveis, para que a fermentação consiga atingir pelo menos 40 g/L de bioetanol (YAN *et al.*, 2012), sendo necessário a utilização de alta concentração de substrato.

Apesar de o estudo estatístico apontar que o aumento dos níveis testados de cada variável seria interessante para se chegar em melhores resultados em termos da concentração de glicose, existem limitações operacionais que impediram esse aumento. Como o intuito das otimizações seria reproduzi-las com *empty fruit bunches* pré-tratados - EFB_t, um teste prévio foi realizado com diferentes concentrações deste substrato (5%, 10%, 15% e 20% m/v). Constatou-se que acima de 15% (m/v), o sólido absorvia todo o líquido presente, restando pouco líquido livre. Ainda, o aumento da concentração de substrato prejudica a agitação, a diluição e a ação das enzimas no meio reacional. Portanto, esta seria a concentração limite a ser empregada.

Assim, os níveis das variáveis, concentração de Avicel, concentração de Celluclast e tempo de hidrólise não foram aumentados. Já que a melhor resposta para a concentração final de glicose ocorreu com a concentração de substrato de 15%, este valor foi escolhido para se manter fixo na próxima etapa de otimização que empregou um Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR. Embora não tenha sido detectado a presença do açúcar celobiose nos hidrolisados estudados, foi aumentada a variável concentração da enzima Novozymes 188, de 0,4 para 1% (v/v), na próxima etapa, devido ao conhecimento da importância desta enzima na hidrólise total da celulose, e levando em consideração que esta variável apresentou maior efeito significativo. Assim, pode-se avaliar melhor a sua interferência na hidrólise da celulose.

Por fim, a próxima etapa da otimização consistiu em realizar uma análise mais completa das concentrações de enzima Novozymes 188 e das demais condições, tempo de hidrólise e concentração de Celluclast 1.5L, necessários para se atingir melhores condições para hidrólise enzimática com 15% (m/v) de substrato.

Segunda etapa de otimização – Delineamento Composto Central Rotacional - DCCR 2³

O Delineamento Composto Central Rotacional - DCCR foi utilizado para otimizar a resposta de obtenção de hidrolisado rico em açúcares (glicose) a partir do substrato Avicel, conforme os resultados obtidos na primeira etapa. Nesta etapa a concentração do substrato 15% (m/v) foi mantida fixa em todos os experimentos, entretanto, os níveis máximos das variáveis tempo de hidrólise (72 h) e concentração da enzima Celluclast 1.5L (4% v/v), não foram ultrapassados. A concentração da enzima Novozymes 188 foi aumentada de 0,4% para 1% (v/v). A melhor concentração desta enzima no planejamento fatorial incompleto, primeira fase, se encontra na extremidade da faixa estudada, sendo necessário investigar valores mais altos para verificar se há aumento na concentração obtida de glicose.

Na TABELA 22 é possível observar os níveis decodificados das variáveis dependentes: tempo de hidrólise (h) e concentração das enzimas comerciais Celluclast 1.5L e Novozymes 188 (% v/v) e a variável dependente, concentração de glicose obtida no hidrolisado após hidrólise enzimática do substrato Avicel pelas enzimas citadas acima, bem como os rendimentos da hidrólise enzimática.

Dentre as variações observadas da variável resposta na TABELA 22 (39,6 - 94,2 g/L), o resultado que representa a maior concentração de glicose obtida com a sacarificação enzimática de Avicel, 94,2 g/L, foi o ensaio 8. Este resultado foi alcançado sob as seguintes condições: 58,5 h; 3,3% de Celluclast e 0,8% de Novozymes 188. Através destas condições, também foi observado o maior rendimento em mg de glicose por g de substrato utilizado e em porcentagem de conversão da celulose em glicose.

Entretanto, considerando o desvio padrão obtido pela média dos pontos centrais que foi de $\pm 1,9$ g/L, os pontos 10 e 14 e os pontos centrais, com 92,1 e 93,6, e 88,9 g/L respectivamente, estão muito próximos à 94,2 g/L. Assim pode-se estimar uma faixa ótima de resultado em concentração de glicose incluindo os ensaios 8,10,14 e os pontos centrais, de 88,9-94,2 g/L de glicose. Nesta faixa variam o tempo entre 38,9-72 h, a concentração da enzima Celluclast 1.5L de 2,2-3,3% (m/v) e da enzima Novozymes 188 de 0,5-1,0% (v/v). Diante da faixa ótima observada, dois ensaios que se destacam pelas e maiores respostas e rendimentos, o ensaio 8

e o ensaio 14. Como o ensaio 14 ocorreu em menos tempo 38,9 h e com uma menor concentração da enzima principal Celluclast 1.5L, 2,2% (v/v), em comparação com o maior resultado observado (ensaio 8), ele foi escolhido como o melhor para esta hidrólise.

TABELA 22 - DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL COM 3 VARIÁVEIS – SEGUNDA ETAPA DE OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO AVICEL

ENSAIOS	FATORES			RESPOSTA	RENDIMENTOS	
	TEMPO (h)	[CELLUCLAST] (%) (v/v)	[NOVOZYMES 188] (%) (v/v)	GLICOSE (g/L)	RENDIMENTO (%)	mg DE GLICOSE/ 1 g DE AVICEL*
1	19,4	1,2	0,2	52,6	31,6	350,8
2	19,4	1,2	0,8	52,8	31,7	351,9
3	19,4	3,3	0,2	64,5	38,7	429,9
4	19,4	3,3	0,8	73,4	44,0	489,3
5	58,5	1,2	0,2	77,2	46,3	514,6
6	58,5	1,2	0,8	87,4	52,5	582,9
7	58,5	3,3	0,2	87,8	52,7	585,5
8	58,5	3,3	0,8	94,2	56,5	627,7
9	6,0	2,2	0,5	39,6	23,7	263,8
10	72,0	2,2	0,5	92,1	55,3	614,3
11	38,9	0,5	0,5	52,8	31,7	351,9
12	38,9	4,0	0,5	80,9	48,5	539,0
13	38,9	2,2	0,0	56,5	33,9	376,8
14	38,9	2,2	1,0	93,6	56,2	624,1
15 (C)	38,9	2,2	0,5	88,2	52,9	588,2
16 (C)	38,9	2,2	0,5	90,4	54,2	602,6
17 (C)	38,9	2,2	0,5	91,2	54,7	608,2
18 (C)	38,9	2,2	0,5	87,0	52,2	579,7
19 (C)	38,9	2,2	0,5	87,1	52,3	580,6

*Produção de glicose/Avicel

Números em negrito representam os maiores valores de sua respectiva coluna

Alguns ensaios apresentaram celobiose na análise, 5-6-7-10-11-13 e 15, variando de 0,35 até 6,6 g/L. O maior valor encontrado foi no ensaio 13, onde a concentração da enzima Novozymes 188 era 0% (v/v), justificando o resultado. Este resultado também influenciou na escolha do ensaio 14 como o melhor em questão, pois não foi detectado celobiose residual.

Os rendimentos não foram elevados devido à grande concentração de sólidos, 15% (m/v), conforme discutido anteriormente. Entretanto, a concentração de glicose do hidrolisado, acima de 80 g/L, é compatível com uma aplicação, por exemplo, um estudo de produção de bioetanol (YAN *et al.*, 2012). A relação Celluclast 1.5L e Novozymes 188 nesta condição, foi de aproximadamente 4:1, chegando-se a um rendimento de 56,5% de conversão. Uma proporção de 5:1 (Celulase e Novozymes 188) foi utilizada para sacarificação de papel filtro, chegando-se a um rendimento de aproximadamente 45% de conversão celulósica, com 15% (m/v) de sólidos em 60 h de hidrólise (KRISTENSEN, FELBY, e JØRGENSEN, 2009).

Através da ANOVA, TABELA 23, observa-se ver que todas as variáveis estudadas: tempo de hidrólise (h), % da concentração das enzimas Celluclast 1.5L e Novozymes 188 (v/v) foram significativas ($p < 0,05$) no termo linear. Em relação ao termo quadrático, apenas a variável concentração de Novozymes 188 não foi significativa. O R^2 obtido, o qual está apresentado na TABELA 23, é de 0,93, sendo considerado excelente para um planejamento experimental do tipo DCCR.

TABELA 23 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE PRODUZIDA APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE AVICEL COM DCCR UTILIZANDO AS ENZIMAS COMERCIAIS CELLUCLAST 1.5L E NOVOZYMES 188 – SEGUNDA ETAPA

FATORES	SQ	GL	QM	F	p
(1)Tempo (h)(L)	2698,173	1	2698,173	67,53471	0,000018*
Tempo (h)(Q)	661,640	1	661,640	16,56070	0,002802*
(2)% Celluclast (v/v)(L)	692,650	1	692,650	17,33689	0,002434*
% Celluclast (v/v)(Q)	597,343	1	597,343	14,95138	0,003808*
(3)% Novozymes 188 (v/v)(L)	578,832	1	578,832	14,48804	0,004177*
% Novozymes 188 (v/v)(Q)	189,779	1	189,779	4,75012	0,057223
1L por 2L	28,556	1	28,556	0,71474	0,419781
1L por 3L	7,008	1	7,008	0,17540	0,685175
2L por 3L	2,905	1	2,905	0,07271	0,793517

SQ = Soma dos Quadrados; GL= Graus de Liberdade; QM= Quadrado Médio; L = interação linear; Q = interação quadrática; R^2 (coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta)=0,93. *Valores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p < 0,05$)

No gráfico de Pareto (FIGURA 32) observam-se que os efeitos positivos referentes às variáveis testadas com diferença significativa ($p < 0,05$) relacionam-se aos termos lineares, ou seja, qualquer um dos níveis destas que forem aumentados produzirá uma resposta positiva (produção de glicose). As interações das variáveis não foram significativas, e a única que mostrou um efeito negativo foi: tempo de hidrólise com a enzima Celluclast. Quanto à significância, no termo quadrático, a concentração da enzima Novozymes 188, foi a única que não foi significativa ($p > 0,05$), e como o efeito referido é negativo isto indica que pode-se trabalhar com esta enzima nas condições do nível mínimo estudado nesta etapa.

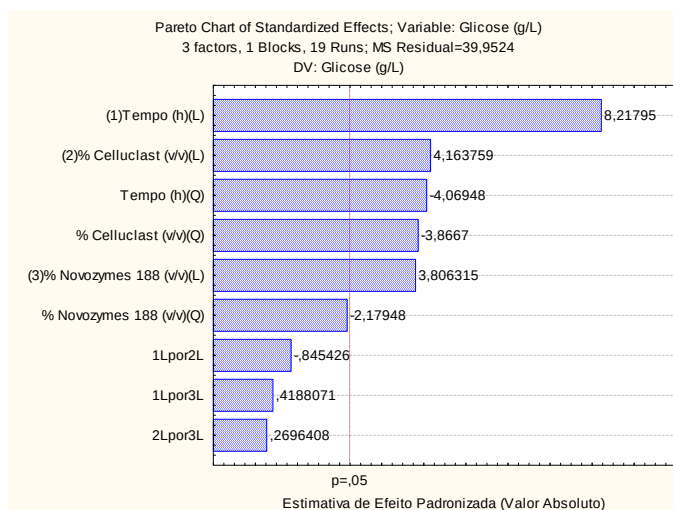


FIGURA 24 - DIAGRAMA DE PARETO OBTIDO A PARTIR DO DCCR PARA A PRODUÇÃO DE GLICOSE - SEGUNDA ETAPA DA OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO AVICEL

Nas superfícies de contorno geradas (FIGURA 33 A-C) é possível observar que as faixas ótimas de produção de glicose, de 80-100 g/L, estão situadas próximas aos pontos centrais das variáveis estudadas até os pontos axiais positivos do DCCR. A variação da concentração de glicose foi pequena nesta faixa ótima, como por exemplo, de 88,8 g/L (média dos pontos centrais) a 94,2 g/L, na melhor condição, como observado na TABELA 22.

Observa-se na FIGURA 33 A e B que, após o nível máximo da variável tempo de hidrólise de 72 h, a tendência da variável resposta é diminuir. Sheehan e Himmel (1999) destacam a dificuldade de se produzir combustíveis a partir de

materiais lignocelulósicos com hidrólise enzimática, devido à necessidade de altas concentrações enzimáticas a fim de se obter grandes concentrações de glicose. Ainda, longos tempos de hidrólise são usuais devido à rápida diminuição da taxa de hidrólise. Assim, conclui-se que o tempo é essencial, mas por outro lado pode-se prejudicar a eficiência enzimática nas condições testadas. Yang, Willies, e Wyman (2006) estudaram esta desaceleração na taxa de hidrólise em Avicel, e afirmam que ela não é interrompida devido a uma perda de reatividade de celulose, mas provavelmente o que acontece é que a ação das enzimas pode ser retardada por obstáculos que interferem no seu percurso, ou uma perda de atividade, e/ ou capacidade de processamento tornando-as menos eficazes.

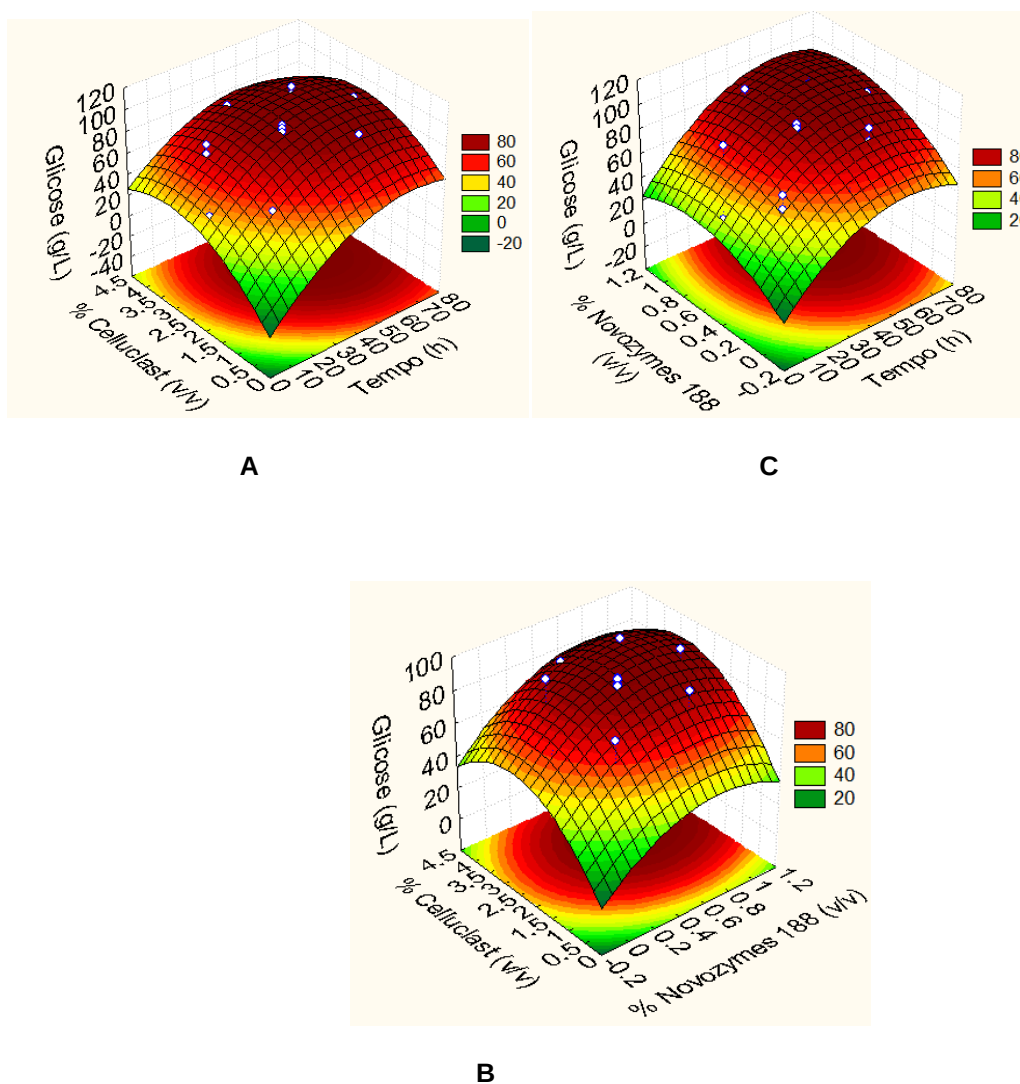


FIGURA 25 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO DCCR PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE OBTIDA APÓS SACARIFICAÇÃO DE AVICEL EM FUNÇÃO: **A** - DO TEMPO E DA CONCENTRAÇÃO DE CELLUCLAST 1.5L; **B** - DA CONCENTRAÇÃO DAS DUAS ENZIMAS; **C** - DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA NOVOZYMES 188 E DO TEMPO

A relação entre as duas enzimas utilizadas é observada na FIGURA 33C onde o nível de concentração da enzima Novozymes 188 alcança a faixa ótima a partir de 0,4% (v/v), nível este testado na primeira parte da otimização. Tal fato comprova que o aumento da concentração desta enzima para 1% (v/v) foi importante para os mesmos níveis de Celluclast 1.5L testados nos dois casos. Ao analisar a FIGURA 33B também é possível observar o mesmo comportamento da enzima Novozymes 188 em relação ao tempo de hidrólise a partir da concentração de 0,4% (v/v).

A equação 9 foi gerada pelos coeficientes de regressão dados pelo programa Statística 5,0 e descreve o modelo experimental do DCCR com as enzimas comerciais Celluclast 1.5L e Novozymes 188 para a resposta em concentração de glicose (g/L):

$$Z = - 37,5859 + 2,2552*t - 0,0181*t^2 + 36,9961*C - 6,1283*C^2 + 54,0974*N - 42,7760*N^2 - 0,0929 *t*C + 0,1663*t*N + 2,0192*C* \text{ (Equação 9)}$$

Onde, Z= [glicose] (g/L); t=Tempo de hidrólise (h); C= % Celluclast 1.5L (v/v); N= % Novozymes 188 (m/v).

Em resumo, após duas etapas de otimização realizadas com o substrato Avicel e as enzimas comerciais Celluclast 1.5L e Novozymes 188, a variável resposta aumentou de 87,3 g/L na primeira etapa com planejamento fatorial incompleto, para uma faixa de 88,8-94,2 g/L com o DCCR. Um aumento de 7% na concentração final de glicose presente no hidrolisado, considerando para estas comparações o valor 93,6 g/L referente ao ensaio 14, escolhido como o melhor do planejamento. As condições iniciais que eram: 4 e 0,4% (v/v) das enzimas, respectivamente, tempo de hidrólise de 72 h e com 15% (m/v) de Avicel foram diminuídas na segunda etapa. O tempo de 72 h passou a 38,9 h e a concentração de Celluclast de 4% para 2,2% (v/v). A concentração da enzima Novozymes 188 na concentração de 0,4% (v/v), teve um aumento para 1,0% (v/v). Este fato confirma a FIGURA 32 que mostra a influência positiva desta enzima na resposta, assim, uma maior resposta foi alcançada com maior nível da concentração da enzima e menores tempo de hidrólise e concentração da enzima principal, Celluclast 1.5L, para uma mesma concentração de 15% (m/v) de sólidos testada.

4.5.1.2 Otimização da hidrólise enzimática de Avicel com a enzima comercial Cellic CTec2

DCCR para hidrólise de Avicel com a enzima comercial Cellic CTec 2

Quando há 2 ou 3 variáveis independentes, recomenda-se realizar diretamente um Delineamento Composto Central Rotacional - DCCR (RODRIGUES e IEMMA, 2005). Isto eliminou a necessidade de uma etapa suplementar de otimização como a que ocorreu com o uso da enzimas Celluclast 1.5L e Novozymes 188.

Portanto, com o objetivo de avaliar os fatores: tempo de hidrólise, concentração de substrato (Avicel) e de enzima Cellic CTec2, que interferem na concentração de glicose produzida pela sacarificação enzimática do substrato Avicel PH 101, foi realizado um DCCR.

Na TABELA 24 é possível observar os níveis decodificados de cada uma das variáveis dependentes (fatores): tempo de hidrólise (h), concentração de Avicel (% m/v) e de Cellic CTec2 (v/v). A variável resposta foi a glicose obtida no hidrolisado (g/L), bem como os respectivos rendimentos.

A variação entre as respostas observadas na TABELA 24 foi de 46,9 a 101,7 g/L de glicose, obtidas após a hidrólise enzimática de Avicel com a enzima Cellic CTec2. A maior resposta, 101,7 g/L, foi alcançada no ensaio 8, por meio das seguintes condições: 58,5 h, 3,3% (v/v) de enzima Cellic CTec2 e 13% (m/v) de substrato Avicel, produzindo um hidrolisado com 101,7 g/L de glicose. Entretanto, este resultado não é acompanhado pelos melhores rendimentos, que ficaram mais evidentes no ponto 6, em que as condições diferem apenas na concentração de substrato (7,2% m/v). A relação da sacarificação enzimática e a quantidade teor de sólidos já foi discutida na seção 4.5.1.1, referenciada por Ioelovich e Morag (2012). A diminuição da conversão obtida com o aumento da concentração de sólidos é um efeito genérico e intrínseco descrevendo uma correlação linear crescente entre 5-30% (m/v) de teor de sólidos iniciais (KRISTENSEN, FELBY e JORGENSEN, 2009).

Considerando o desvio padrão dos pontos centrais, $\pm 4,9$ g/L, os ensaios 7 e 12 da TABELA 24 também mostraram bons resultados, 94,8 e 92,0 g/L em glicose, semelhantes à 101,7 g/L. Portanto, concluímos que houve uma faixa ótima de

resposta, em que a concentração de glicose variou de 92-101,7 g/L. Para esta faixa de resultados, a concentração de enzima variou de 2,2-3,3% (v/v), a concentração de substrato de 13-15% (m/v) e o tempo de hidrólise de 38,9-58,5 h. Entre os resultados desta faixa ótima, pode-se destacar o ensaio 12 como sendo o melhor para a sacarificação em questão, uma vez que é o terceiro melhor resultado, obtido em menor tempo, 38,9 h e com menor concentração da enzima Cellic Ctec2 de 2,2% (v/v) do que a maior resposta observada.

TABELA 24 - DCCR COM 3 VARIÁVEIS – OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO AVICEL COM A ENZIMA CELLIC CTEC2

ENSAIOS	TEMPO (h)	FATORES		RESPOSTA	RENDIMENTOS	
		AVICEL (%) (m/v)	[CELLIC CTEC2] (%) (v/v)	[GLICOSE] (g/L)	RENDIMENTO (%)	mg GLICOSE/ 1 g DE AVICEL*
1	19,4	7,0	1,2	49,6	63,5	705,5
2	19,4	7,0	3,3	46,9	60,1	667,7
3	19,4	13,0	1,2	64,2	44,6	495,3
4	19,4	13,0	3,3	76,9	53,4	593,7
5	58,5	7,0	1,2	62,6	80,2	891,4
6	58,5	7,0	3,3	71,6	91,8	1176,4
7	58,5	13,0	1,2	94,8	65,9	731,8
8	58,5	13,0	3,3	101,7	70,7	785,0
9	6,0	10,0	2,2	48,8	44,0	488,6
10	72,0	10,0	2,2	88,6	79,8	886,7
11	38,9	5,0	2,2	47,6	85,6	951,5
12	38,9	15,0	2,2	92,0	55,2	613,0
13	38,9	10,0	0,5	56,2	50,6	579,2
14	38,9	10,0	4,0	81,5	73,4	815,3
15 (C)	38,9	10,0	2,2	80,6	72,6	806,4
16 (C)	38,9	10,0	2,2	70,2	63,2	702,1
17 (C)	38,9	10,0	2,2	82,1	74,0	821,9
18 (C)	38,9	10,0	2,2	78,2	70,4	782,6
19 (C)	38,9	10,0	2,2	81,3	73,3	814,2

*Produção de glicose/Avicel

Números em negrito representam os maiores valores de sua respectiva coluna

Os resultados obtidos para os pontos axiais (presentes nos ensaios de 9 a 14, vide TABELA 24 do planejamento DCCR) permitiram a avaliação dos efeitos das variáveis da sacarificação. O aumento das variáveis: tempo de 6 para 72h, do substrato de 5 para 15% (m/v) e de concentração da enzima Cellic CTec2 de 0,5 para 4% (v/v), proporcionou um aumento da resposta da hidrólise enzimática de 1,8; 1,9 e 1,45 vezes, respectivamente. Estes dados confirmam que todos níveis máximos das variáveis testadas foram suficientes para aumentar em pelo menos 1,7 vezes, em média, o resultado da resposta final da concentração de glicose obtido com os níveis mínimos.

Após a ANOVA, a qual é apresentada na TABELA 25, pode-se observar que todas as variáveis estudadas: tempo de hidrólise (h), concentração da enzima Cellic CTec2 e do substrato Avicel foram significativas ($p < 0,05$) no termo linear. O R^2 obtido nesta é de 0,96, o qual é um bom resultado para um planejamento experimental do tipo DCCR, e mostra que os dados se ajustaram ao modelo.

TABELA 25 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (G/L) PRODUZIDA APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM DCCR UTILIZANDO: CELLIC CTEC2 E AVICEL

FATORES	SQ	GL	QM	F	p
(1)Tempo (h)(L)	1878,839	1	1878,839	78,8270	0,000010*
Tempo (h)(Q)	117,140	1	117,140	4,9146	0,053836
(2)% Avicel (m/v)(L)	2418,148	1	2418,148	101,4538	0,000003*
% Avicel (m/v)(Q)	89,202	1	89,202	3,7425	0,085050
(3)% Cellic CTec2 (v/v)(L)	344,571	1	344,571	14,4565	0,004203*
% Cellic CTec2 (v/v)(Q)	112,756	1	112,756	4,7307	0,057640
1L por 2L	39,011	1	39,011	1,6367	0,232774
1L por 3L	4,225	1	4,225	0,1773	0,683603
2L por 3L	22,078	1	22,078	0,9263	0,360974

SQ= Soma dos Quadrados, GL= Graus de Liberdade, QM= Quadrado Médio; L = interação linear; Q = interação quadrática; R^2 (coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta) = 0,96

*Valores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p < 0,05$)

As variáveis significativas no termo linear, $p < 0,05$, apresentaram no gráfico de pareto (FIGURA 34) efeitos positivos na resposta. Em ordem decrescente tem-se: concentração de Avicel (% m/v) e da enzima Cellic CTec2 (v/v), ou seja, o aumento dos níveis destas variáveis irá aumentar a concentração de glicose final. As interações entre as variáveis e os termos lineares não foram significativas nesta condição.

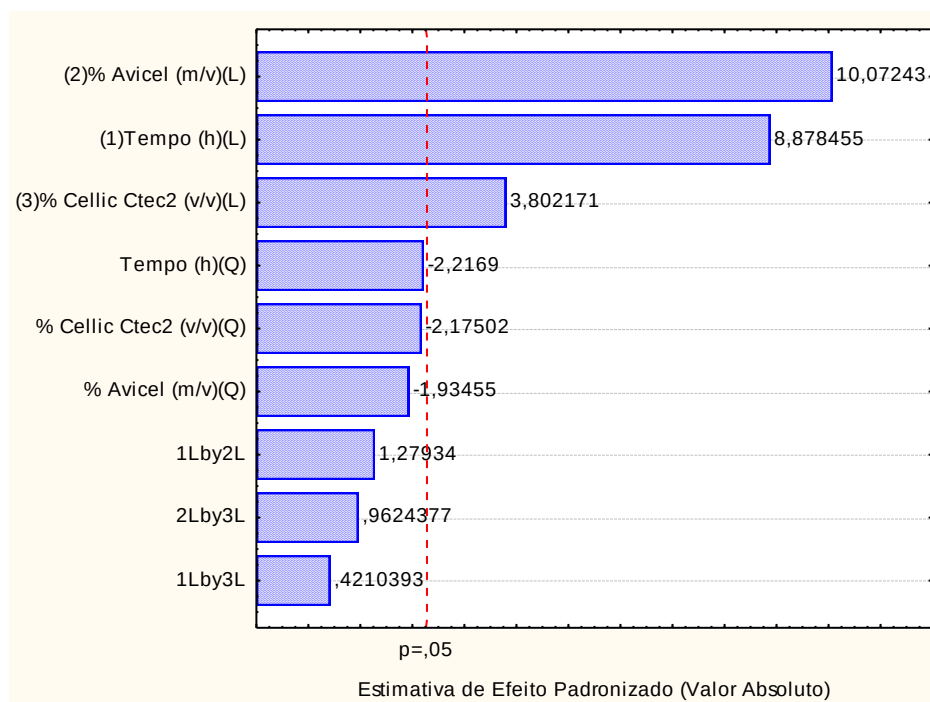


FIGURA 26 - GRÁFICO DE PARETO - DCCR PARA A PRODUÇÃO DE GLICOSE DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE AVICEL COM A ENZIMA COMERCIAL CELLI CTEC2

A partir das superfícies de resposta (FIGURA 35) nota-se que à medida que os níveis das variáveis aumentam a resposta aumenta também, uma vez que as faixas ótimas da variável resposta, 80-100 g/L, encontram-se próximas aos níveis mais altos das variáveis estudadas: tempo de hidrólise e concentrações da enzima e do substrato Avicel, como pode ser observado também na TABELA 24. O longo tempo de hidrólise gerou respostas menores do que as hidrólises mais curtas (FIGURA 35 A e B) como ocorreu na otimização da sacarificação enzimática de Avicel com as enzimas Celluclast e Novozymes 188. Foi detectado que com estas duas enzimas que, nas condições testadas, o longo tempo de hidrólise começa a ser prejudicial à hidrólise enzimática da glicose, e é sugerido que este fato estava ligado principalmente à ação enzimática do que ao substrato, como discutido anteriormente (YANG, WILLIES e WYMAN, 2006). Assim, conclui-se que a enzima Cellic CTec2 é mais estável do que a Celuclast 1.5L durante a hidrólise enzimática de Avicel.

Como todas as variáveis mostraram diferença significativa no termo linear, o aumento dos níveis das variáveis (tempo, concentração do substrato e de enzima)

para tentar se achar o ponto ótimo da superfície, não seria viável operacionalmente e economicamente.

As melhores respostas para a concentração de glicose produzida com concentrações altas (FIGURA 35C) já eram esperadas uma vez que em maior quantidade, o substrato gera uma maior quantidade de produto, no caso glicose (g/L). Assim, a concentração da enzima Cellic CTec2 acima de 1% (v/v), produziu respostas nas faixas ótimas em relação à concentração de Avicel a partir de 12% (m/v).

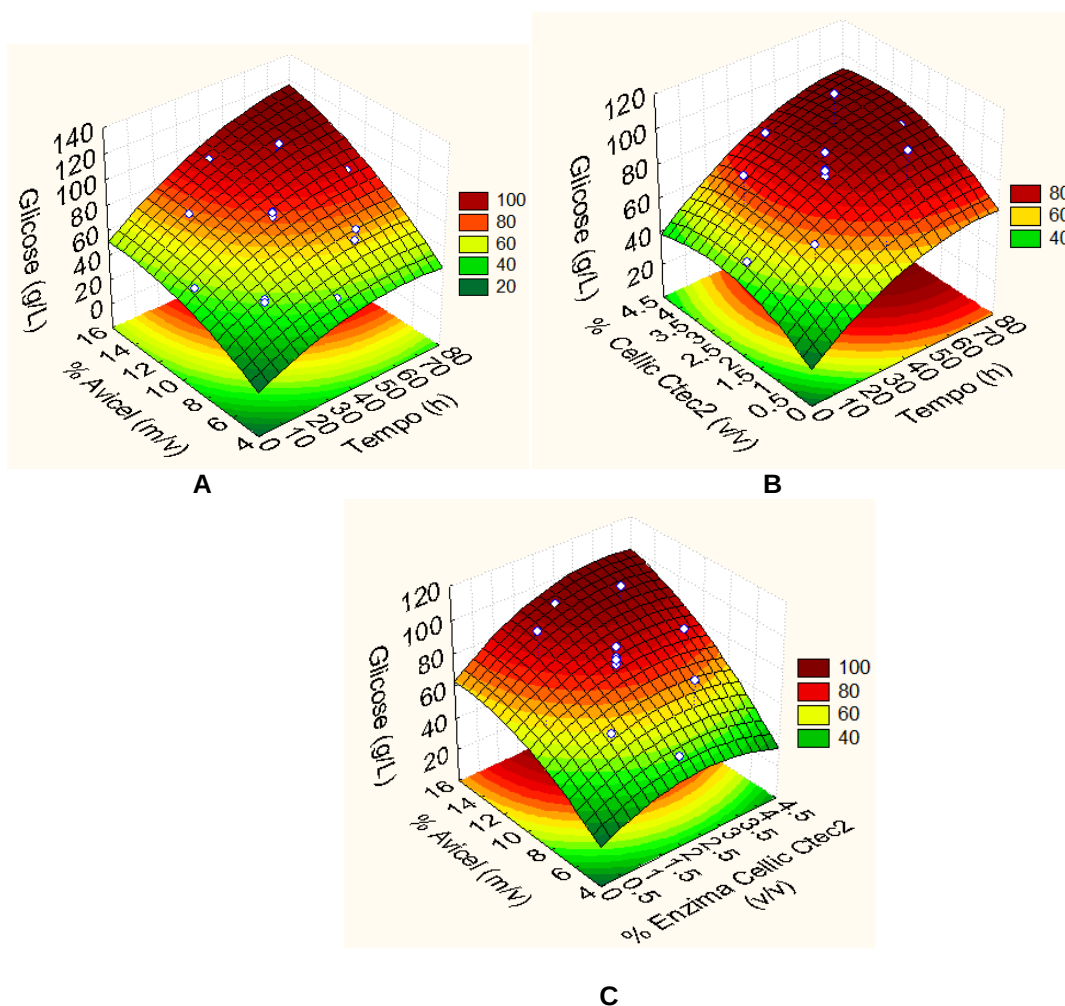


FIGURA 27 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO DCCR PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE EM FUNÇÃO: **A** - DA CONCENTRAÇÃO DE AVICEL E DO TEMPO; **B** - DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA CELLIC CTEC2 E DO TEMPO; **C** - DAS CONCENTRAÇÕES DE AVICEL E DE CELLIC CTEC2

A partir dos coeficientes de regressão dados pelo programa Statística 5 ® após o estudo utilizando o DCCR para a sacarificação de Avicel com a enzima Cellic CTec2, foi gerada a seguinte Equação 10 para a concentração de glicose (g/L):

$$Z = -24,4051 + 0,7317*t - 0,0076*t^2 + 7,5751*A - 0,2895*A^2 + 9,9964*C - 2,6570*C^2 + 0,0380*t*A + 0,0357*t*C + 0,5389*A*C \quad (\text{Equação 10})$$

Onde, Z = Glicose (g/L); t= Tempo de hidrólise (h); A = [Avicel] (m/v); C = [Cellic CTec2] (v/v).

Em todos os ensaios utilizando a enzima Cellic CTec 2 deste experimento não foi detectada a presença de celobiose, mostrando que a quantidade de celobiase presente foi suficiente para uma boa conversão da celobiose em glicose.

O uso da enzima Cellic CTec2 é mais atrativo pois já contém celulasas e β -glicosidases, além de não ter celobiose residual como ocorreu com a otimização da Avicel com a Celluclast. Em relação à resposta final do DCCR dos dois complexos enzimáticos, um composto somente por Cellic CTec2, e outro por Celluclast 1.5L e Novozymes 188, a concentração de glicose foi praticamente a mesma: 92 e 93,6 g/L respectivamente. Comparando os resultados escolhidos nos DCCRs aplicados à hidrólise enzimática do Avicel, a principal diferença observada entre as condições está no uso da enzima Novozymes 188, 1,0% (v/v) no ensaio 14 da TABELA 22 (Celluclast 1.5L e Novozymes 188), que não existe no ensaio 12 da TABELA 24 (Cellic CTec2), visto que a enzima Cellic CTec2 já contém β -glicosidases. A concentração da enzima principal, 2,2% (v/v), do substrato 15% (m/v) e do tempo de hidrólise 38,9 h, são os mesmos em ambos os casos.

Nestas condições citadas acima, os rendimentos com a enzima Cellic CTec também foram semelhantes do que com o uso das enzimas Celluclast 1.5L e Novozymes 188 em conjunto, gerando 55,2% de conversão da celulose em glicose, e 613,0 mg de glicose obtida a cada 1g de Avicel utilizada (TABELA 24), e 56,2% e 624,1 mg glicose/g de Avicel (TABELA 22) respectivamente.

Não foram encontrados na literatura dados relatando hidrólise enzimática de Avicel com esta enzima, mas pode-se observar que ela propiciou bons resultados em outros tipos de substratos. Assim, os dados da otimização da hidrólise enzimática com Cellic CTec2 e o planejamento DCCR foram repetidos com EFB_t para avaliar o comportamento da enzima, e as condições para os dois substratos.

4.5.2 Estudo das otimizações do processo de hidrólise enzimática do substrato palma pré-tratada (EFB_t)

Os planejamentos do tipo DCCR realizados anteriormente com o substrato sintético Avicel, foram reproduzidos substituindo o Avicel por EFB_t como substrato, exatamente nas mesmas condições físicas e com repetição de cada ensaio do respectivo planejamento, um com as enzimas Celluclast 1.5L (4.5.1.1) em conjunto com a Novozymes 188, o outro com a enzima Cellic CTec2 (4.5.1.2).

4.5.2.1 Otimização da hidrólise enzimática com as enzimas comerciais Celluclast 1.5L, Novozymes 188 para o substrato EFB_t

O DCCR foi utilizado para maximizar a resposta de concentração final de glicose no hidrolisado a partir de EFB_t. Os níveis e as variáveis testadas foram as mesmas do item 4.5.1.1, portanto, a concentração do substrato foi de 15% (m/v), o tempo variou de 6-72h, e as concentrações das enzimas: Celluclast 1.5L de 0,5-4% (v/v) e a de Novozymes 188 de 0-1% (v/v).

Através da TABELA 26 é possível observar os níveis decodificados das variáveis independentes: tempo de hidrólise (h), e % de concentração das enzimas (v/v) Celluclast 1.5L e Novozymes 188, a variável resposta (variável dependente) dada pela concentração de glicose em g/L encontrada no hidrolisado, e também os valores dos rendimentos em porcentagem de EFB_t convertida em glicose, bem como a produção em mg glicose a partir de 1 g de EFB_t.

TABELA 26 – OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO EFB_t COM AS ENZIMAS CELLUCLAST 1.5L E NOVOZYMES 188

ENSAIOS	TEMPO (h)	FATORES		RESPOSTA	RENDIMENTOS	
		% CELLUCLAST 1.5L (v/v)	% NOVOZYMES 188 (v/v)	GLICOSE (g/L)	RENDIMENTO (%)	mg DE GLICOSE/ 1 g DE EFB _t *
1	19,4	1,2	0,2	36,4	34,3	242,6
2	19,4	1,2	0,8	51,6	48,5	343,8
3	19,4	3,3	0,2	48,3	45,5	322,3
4	19,4	3,3	0,8	64,0	60,2	426,5
5	58,5	1,2	0,2	47,0	44,2	313,2
6	58,5	1,2	0,8	56,3	53,0	375,2
7	58,5	3,3	0,2	61,8	58,1	411,7
8	58,5	3,3	0,8	65,9	62,1	439,5
9	6,0	2,2	0,5	31,5	29,7	210,1
10	72,0	2,2	0,5	48,6	45,7	323,9
11	38,9	0,5	0,5	33,8	31,8	225,6
12	38,9	4,0	0,5	41,1	38,7	274,1
13	38,9	2,2	0,0	28,2	26,6	188,1
14	38,9	2,2	1,0	65,4	61,5	435,8
15 (C)	38,9	2,2	0,5	63,1	59,4	420,8
16 (C)	38,9	2,2	0,5	64,3	60,5	428,8
17 (C)	38,9	2,2	0,5	63,1	59,4	420,5
18 (C)	38,9	2,2	0,5	61,9	58,2	412,4
19 (C)	38,9	2,2	0,5	63,7	60,0	424,8

*Produção de glicose/EFB_t

Números em negrito representam os maiores valores de sua respectiva coluna

Dos os 19 ensaios realizados na TABELA 26, é possível observar que a concentração de glicose (g/L) após a sacarificação enzimática variou de 28,2 a 65,9 (g/L). A concentração mais alta de glicose encontrada no hidrolisado, ou seja, a maior hidrólise de EFB_t evidenciada através da variável resposta, ocorreu no ensaio 8, que foi de 65,9 g/L, diante das seguintes condições: 58,5h de sacarificação de EFB_t, 3,3% (v/v) de Celluclast 1.5L e 0,8% (v/v) de Novozymes 188. Os melhores

rendimentos obtidos também são referentes ao ensaio 8 (vide TABELA 26), 62,1% de conversão de celulose em glicose e 439,5 mg de glicose/g de EFB_t, após 58,5h de sacarificação, com 3,3% (v/v) de Celluclast 1.5L e 0,8% (v/v) de Novozymes 188. É importante lembrar que estes valores se assemelham com o valor máximo de cada fator independente no planejamento fatorial. Ao serem incrementados estes valores no desenho da superfície resposta observa-se que os valores da concentração são inferiores o que pode indicar que pode existir o ponto ótimo perto dessas condições. Para corroborar esta suposição foi realizada a discriminação dos coeficientes associados a cada fator independente e as interações de segunda ordem entre eles realizando a análise de variância (ANOVA-TABELA 27).

Considerado o desvio padrão dos pontos centrais de $\pm 0,9$ g/L, observamos que houveram outras respostas que se assemelham à 65,9 g/L, é o caso dos ensaios 4,7,14 e os pontos centrais, com 64,0, 61,8, 65,4 e 63,1 g/L (média dos pontos centrais), respectivamente. Diante desta faixa de resposta de 63,1-65,9 g/L, o tempo variou de 19,4-58,5 h, a concentração da enzima Celluclast 1.5L de 2,2-3,3% (v/v) e da enzima Novozymes 188 de 0,2-1,0% (v/v). Diante desta faixa o segundo melhor resultado, que se refere ao ensaio 14, foi destacado como o melhor para este planejamento pois, embora tenha ocorrido um pequeno aumento na concentração da enzima Novozymes 188 para 1% (v/v), houve uma redução no tempo para 38,9 h e na concentração da enzima principal Celluclast 1,5L para 2,2% (v/v) em relação ao resultado mais alto observado (ensaio 8).

Nesta etapa com o EFB_t não foi detectada a presença de celobiose residual como ocorreu com a otimização do Avicel nas mesmas condições.

Em relação à comparação da otimização da hidrólise enzimática do EFB_t, realizada nas mesmas condições com o substrato Avicel (TABELA 22), os valores escolhidos como os melhores em cada situação são ambos relacionados ao ensaio 14. A concentração de glicose diminuiu cerca de 30% em relação ao substrato EFB_t (de 93,6 para 65,4 g/L), este fato pode ser explicado pela Avicel ser composta praticamente 100% de celulose, enquanto que a composição da celulose no EFB_t nesta etapa é de 62,7%. Além disso, a composição do EFB_t contém resíduos de lignina, em maior quantidade, e de hemicelulose que são interferentes na hidrólise enzimática (ALVIRA *et al.*, 2010; ZHENG, PAN, E ZHANG, 2009; BALAT, 2011), que podem ser a explicação para a diminuição da concentração de glicose.

Hassan e colaboradores (2013), conseguiram um rendimento de 348,4 mg de glicose por g de EFB pré-tratado, após otimização da sacarificação enzimática através de uma mistura enzimática composta por 3 partes: 0,9 Celluclast 1.5L:0,03 Viscozyme: 0,07 Novozymes 188 (totalizando 2,51% (v/v) de enzima por grama de EFB pré-tratado com explosão a vapor em conjunto com ácido acético), com 4,5% de concentração de sólidos, e após 35 h de hidrólise. A diferença do rendimento obtido por estes autores pode ser explicada pelas condições utilizadas. A porcentagem de recuperação de glicose ficou muito próxima 62,4% contra 62,1% (vide TABELA 26), entretanto as quantidades de celulose presentes eram praticamente o dobro: 34,4% encontrado pelos referidos autores, e 62,7, por este estudo, e a quantidade de substrato 4,5% e 15% (m/v) respectivamente de cada um.

Os pontos axiais positivos produziram uma concentração de glicose no hidrolisado final, 1,5, 1,2 e 2,3 vezes maior que os pontos axiais negativos para os fatores: tempo, % Celluclast 1.5L e de Novozymes 188, respectivamente. Em comparação com o DCCR destas enzimas com o substrato Avicel, mostram que neste caso a variação da resposta com os pontos axiais positivos foi mais visível para o tempo de reação (2,3 vezes maior que o negativo), enquanto que para o DCCR com EFB_t a concentração da enzima Novozymes 188, produziu uma maior importância no ponto axial positivo, 2,3 vezes maior que o observado no negativo. Ou seja, os fatores que influenciam a resposta da concentração do produto obtido após a hidrólise enzimática, foram diferentes em cada um dos substratos testados. Esta informação pode ser vista na FIGURA 36, onde mostra que a variável concentração de Novozymes 188 é altamente significativa e produz um efeito positivo na resposta para o EFB_t.

Hassan e colaboradores (2013) encontram que para a sacarificação do EFB pré-tratado todos os fatores testados: concentração das enzimas (Celluclast 1.5L+Novozymes 188+Viscozymes), do substrato e o tempo de hidrólise, foram significativos para o aumento da concentração final de glicose, sendo que a concentração das enzimas foi o fator mais importante.

A partir do gráfico de pareto, FIGURA 36, é possível observar as variáveis que foram significativas ($p < 0,05$): concentração da enzima Novozymes (termo linear) e o termo quadrático da variável concentração da enzima Celluclast 1.5L. A concentração da enzima Novozymes 188 no termo linear possui efeito positivo na variável resposta, e poderá aumentar a concentração de glicose.

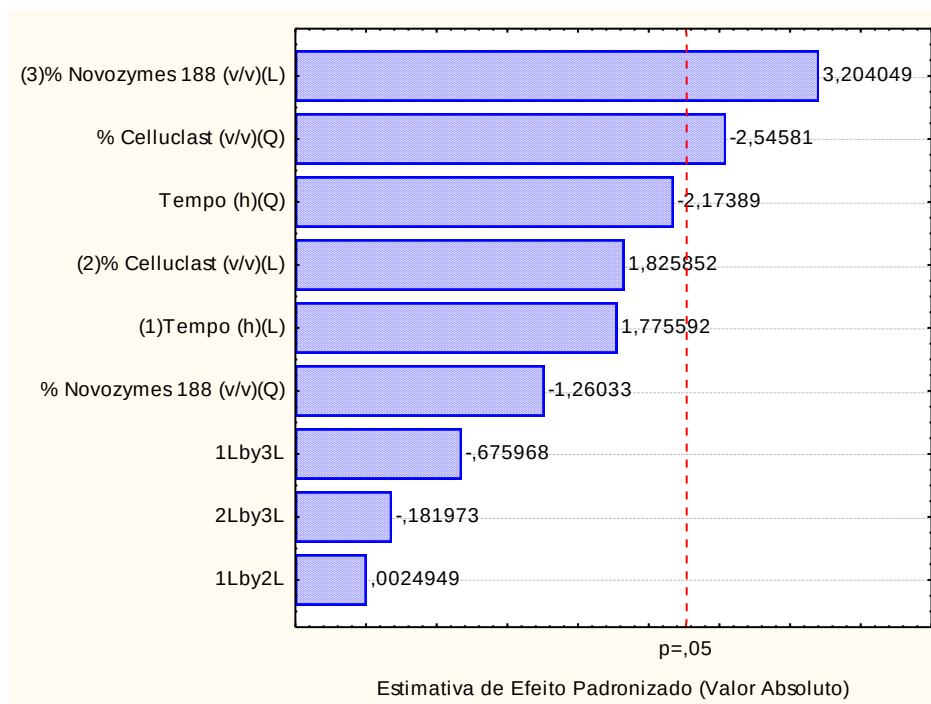


FIGURA 28 - GRÁFICO DE PARETO APRESENTANDO OS EFEITOS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS ($p < 0,05$) A PARTIR DO DCCR PARA A PRODUÇÃO DE GLICOSE DURANTE A SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE EFB_t COM AS ENZIMAS COMERCIAIS CELLUCLAST 1.5L E NOVOZYMES 188

Através da TABELA 27 a análise de variância mostrou que a concentração da enzima Novozymes 188 foi a única variável significativa no termo linear, enquanto que a concentração da enzima Celluclast 1.5L foi significativa no termo quadrático, ou seja, já atingiu o ponto ótimo. Para que a enzima Novozymes 188 consiga atingir o ponto ótimo o nível máximo deveria ser aumentado, pois possui efeito positivo, o que não é viável.

O valor do R^2 obtido na TABELA 27 é de 0,75, o qual é aceitável para um planejamento experimental do tipo DCCR. Em comparação com o DCCR com as enzimas Celluclast 1.5L e Novozymes 188 com o substrato Avicel o valor (0,93) do R^2 observado é menor, este fato pode ser explicado pois talvez as enzimas não se comportem do mesmo jeito para os substratos sintéticos, “puros”, e o substrato heterogêneo EFB_t diante às condições estudadas.

TABELA 27 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE PRODUZIDA APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM PLANEJAMENTO DCCR UTILIZANDO: CELLUCLAST 1.5L E NOVOZYMES 188 E EFB_t

	SQ	GL	QM	F	p
(1)Tempo (h)(L)	259.323	1	259.3235	3.15273	0.109536
Tempo (h)(Q)	388.715	1	388.7149	4.72580	0.057746
(2)% Celluclast (v/v)(L)	274.212	1	274.2121	3.33373	0.101160
% Celluclast (v/v)(Q)	533.099	1	533.0994	6.48116	0.031410*
(3)% Novozymes 188 (v/v)(L)	844.411	1	844.4108	10.26593	0.010761*
% Novozymes 188 (v/v)(Q)	130.655	1	130.6551	1.58844	0.239244
1L por 2L	0.001	1	0.0005	0.00001	0.998064
1L por 3L	37.584	1	37.5845	0.45693	0.516053
2L por 3L	2.724	1	2.7238	0.03311	0.859636

SQ= soma dos quadrados, GL= graus de liberdade, QM = quadrado médio; L = interação linear; Q = interação quadrática; R² (coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta)=0,75

*Valores estatisticamente significativos a 95% de confiança (p < 0,05)

A FIGURA 37, A-C, mostra as superfícies de contorno geradas a partir dos resultados da sacarificação enzimática de EFBs_t com as enzimas Celluclast e Novozymes 188. A faixa ótima da resposta está entre 50 a 60 g/L.

Como visto na FIGURA 37 A e B, a resposta de concentração de glicose presente no hidrolisado é menor conforme o tempo de hidrólise é maior. A duração da sacarificação enzimática por mais tempo provoca a queda da concentração de glicose (g/L) no hidrolisado, e pode estar associado com a diminuição da taxa de hidrólise (SHEEHAN e HIMMEL 1999). Este fato também foi observado e discutido na segunda etapa da otimização enzimática com o substrato Avicel, exatamente nas mesmas condições utilizadas diante deste experimento com o EFB_t.

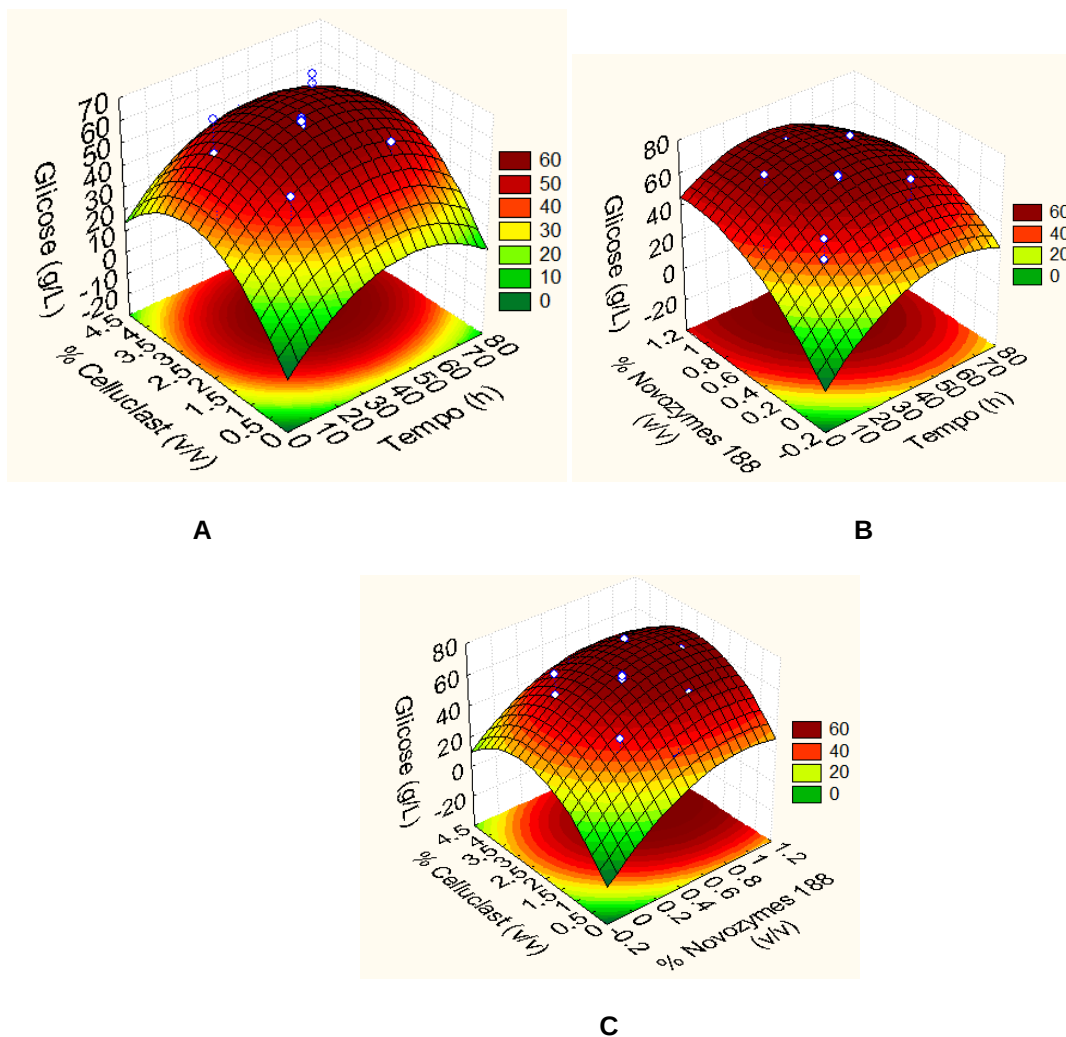


FIGURA 29 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO DCCR PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE EM FUNÇÃO: **A** - DA CONCENTRAÇÃO CELLUCLAST E DO TEMPO; **B** - DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA NOVOZYMES 188 E DO TEMPO; **C** - DAS CONCENTRAÇÕES CELLUCLAST E NOVOZYMES 188

A partir dos coeficientes de regressão do programa Statística 5 ® após a otimização com DCCR para a sacarificação de EFB_t com a enzima Celluclast 1.5L e Novozymes 188, foi gerada a seguinte Equação 11 que descreve as superfícies de contorno, para a concentração de glicose (g/L):

$$Z = - 37,7538 + 1,4968*t - 0,0139t^2 + 31,2883C - 5,7894C^2 + 81,8618N - 35,4927N^2 + 0,0004t*C - 0,3852t*N - 1,9553C*N \quad (\text{Equação 11})$$

Onde, Z = Glicose (g/L); t= Tempo de hidrólise (h); C = [Celluclast 1.5L] (v/v); N = [Novozymes 188] (v/v).

A relação Celluclast 1.5L e Novozymes 188 na melhor condição escolhida (ensaio 14), foi de aproximadamente 2:1. Uma proporção ótima de 5:1 (Celluclast 1.5L e Novozymes 188) foi estabelecida como ótima para a sacarificação de EFB pré-tratado com LHW, após 24 h de reação, produzindo 2,5 g/L de glicose (HAMZAH, IDRIS e SHUAN, 2011). Os autores afirmam que o efeito da combinação de celulase com β 1-4 glicosidades é melhor que o uso apenas de celulases em EFB pré-tratado nestas condições.

Aproximadamente 180 g de glicose/kg de EFB pré-tratado apenas com 15 minutos de tratamento à vapor, foi encontrada após 24h de sacarificação enzimática utilizando Celluclast 1.5L (25 FPU/g de substrato e 5% m/v de concentração de substrato) (SHAMSUDIN *et al.*, 2012). O baixo rendimento pode estar relacionado pela falta do uso da enzima Novozymes 188.

EFBs, 2% m/v, pré-tratado com ácido e posterior branqueamento, ou seja, restando a holocelulose (celulose+hemicelulose), produziu 35,8 g/L de glicose e 45,2% de rendimento após sacarificação enzimática com Celluclast 1.5L e Novozymes 188 (AZIZ *et al.*, 2002).

Os rendimentos da sacarificação também poderiam ser aumentados, se o pré-tratamento da biomassa fosse melhorado, assim, a celulose ficaria mais disponível para o ataque enzimático. Tengborg, Galbe, e Zacchi (2001), estudaram concentrações enzimáticas de Celluclast 2L para a sacarificação da celulose de coníferas, concluíram que a melhor condição para sacarificação enzimática seria utilizando 48 FPU/g de Celluclast. A adição de Novozymes 188 em concentrações acima de 50 IU/g de celulose contribuiu para maiores rendimentos, em torno de 40%, de conversão de celulose em glicose. Os autores aumentaram estas concentrações para 120 FPU/g e 120 IU/g e notaram que a hidrólise completa não foi alcançada, portanto, sugeriram que a melhoria dos pré-tratamentos prévios da biomassa pode aumentar a hidrólise enzimática da celulose.

4.5.2.2 DCCR com o substrato EFB_t e a enzima comercial Cellic CTec2

Com o objetivo de se avaliar o efeito de diferentes concentrações de Cellic CTec2, tempo e concentração de EFB_t interferem na concentração de glicose produzida após a sacarificação enzimática da glicose presente no substrato EFB_t, foi realizado um DCCR com os mesmos níveis e variáveis usados no item 4.5.1.2. Na TABELA 28 pode-se observar a matriz do DCCR que inclui as variáveis: tempo de hidrólise (h), concentração do substrato EFB_t (m/v) e da enzima Cellic CTec2, com os níveis decodificados, as respostas do experimentos, e os rendimentos em porcentagem e em massa.

As variações da resposta para este experimento oscilaram entre 31,8 a 64,9 g/L nos 19 ensaios realizados. O ensaio que representa a melhor condição de hidrólise de EFB_t evidenciada pela maior concentração de glicose (TABELA 28) foi o de número 12. Este ponto apresentou rendimentos de 63,5% de celulose convertida em glicose, e 432,3 mg de glicose obtidos por g de EFB_t. As concentrações de substratos menores possuem maiores rendimentos de conversão de celulose em glicose. A diminuição do rendimento em relação ao aumento da concentração de sólidos presentes já era esperado, uma vez que também foi encontrado na otimização da atividade enzimática com a enzima Cellic CTec2 com o substrato Avicel, além disso a literatura relata que esta relação entre a conversão da celulose obtida e o aumento da concentração de sólidos, é um efeito genérico e intrínseco descrevendo uma correlação linear crescente entre 5-30% (m/v) de teor de sólidos iniciais (KRISTENSEN, FELBY e JORGENSEN, 2009).

Considerando o desvio padrão obtido através dos pontos centrais, de $\pm 2,3$ g/L, outros ensaios como o 8 e o 14, com 63,9 e 61,6 g/L respectivamente, ficam muito próximos à 64,9 g/L. Diante deste fato, existe uma faixa ótima de resultados em concentração de glicose, que varia de 61,6-64,9 g/L. O maior resultado também se destaca entre os outros dois por ocorrer em menor tempo e utilizar a menor quantidade da enzima, sendo escolhido como o melhor ensaio para este planejamento. Não foi detectada a presença de celobiose residual nos ensaios.

TABELA 28 - DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL COM 3 VARIÁVEIS – OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO EFBT COM A ENZIMA CELLIC CTEC2

ENSAIOS	TEMPO (h)	FATORES		RESPOSTA	RENDIMENTOS	
		% EFBT (m/v)	%CELLIC CTEC2 (v/v)	GLICOSE (g/L)	RENDIMENTO (%)	mg GLICOSE/ 1 g DE EFB _t *
1	19,4	7,0	1,2	35,9	75,0	511,0
2	19,4	7,0	3,3	42,0	87,7	597,5
3	19,4	13,0	1,2	49,9	56,5	385,0
4	19,4	13,0	3,3	47,1	53,3	363,5
5	58,5	7,0	1,2	43,5	90,9	619,8
6	58,5	7,0	3,3	48,5	100,0	691,0
7	58,5	13,0	1,2	56,8	64,3	438,3
8	58,5	13,0	3,3	63,9	72,4	493,2
9	6,0	10,0	2,2	36,3	53,3	363,6
10	72,0	10,0	2,2	57,7	84,8	577,8
11	38,9	5,0	2,2	31,8	93,2	635,5
12	38,9	15,0	2,2	64,9	63,5	432,5
13	38,9	10,0	0,5	45,0	66,0	449,9
14	38,9	10,0	4,0	61,6	90,4	616,2
15 (C)	38,9	10,0	2,2	54,0	79,3	540,7
16 (C)	38,9	10,0	2,2	53,2	78,1	532,5
17 (C)	38,9	10,0	2,2	54,1	79,4	541,4
18 (C)	38,9	10,0	2,2	51,9	76,2	519,5
19 (C)	38,9	10,0	2,2	48,5	71,2	485,2

*Produção de glicose/ EFB_t

Números em negrito representam os maiores valores de sua respectiva coluna

Os resultados obtidos para os pontos axiais (presentes nos ensaios de 9 a 14, vide TABELA 28) do planejamento DCCR permitiram a avaliação dos efeitos das variáveis da sacarificação isoladas. O aumento do tempo 6 para 72h, do substrato de 5 para 15% (m/v) e de concentração da enzima Cellic CTec2 de 0,5 para 4% (v/v), proporcionou um aumento na hidrólise enzimática de 1,58; 2,04 e 1,37 vezes respectivamente. Assim, a concentração do substrato EFB_t, foi a variável que mais influenciou a resposta.

O coeficiente de regressão, R^2 , obtido através da TABELA 29 é de 0,92, o qual é ótimo para um planejamento experimental do tipo DCCR, e mostra que os dados se ajustaram bem ao modelo. Em comparação com o DCCR da enzima Cellic CTec2 com o substrato Avicel o valor (0,95) do R^2 também é alto, ou seja, para os dois tipos de substratos tratados com a enzima Cellic CTec2, o sintético e o natural, o modelo foi bem ajustado. A tabela também evidencia que as variáveis: tempo de hidrólise, concentração de EFB_t e da enzima Cellic CTec2 são significativas ($p < 0,05$). Nenhuma das interações entre as variáveis, nem as variáveis no termo quadrático foram significativos.

TABELA 29 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (g/L) PRODUZIDA APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM DCCR UTILIZANDO: CELLIC CTEC2 E AVICEL

FATORES	SQ	GL	SM	F	p
(1)Tempo (h)(L)	400.871	1	400.8708	28.28072	0.000482*
Tempo (h)(Q)	58.610	1	58.6095	4.13480	0.072532
(2)% EFB _t (m/v)(L)	784.939	1	784.9388	55.37603	0.000039*
% Substrato (m/v)(Q)	35.492	1	35.4919	2.50389	0.148025
(3)% EFB _t (v/v)(L)	137.590	1	137.5904	9.70676	0.012407*
% Cellic CTec2 (v/v)(Q)	0.246	1	0.2459	0.01735	0.898103
1L por 2L	11.296	1	11.2955	0.79688	0.395270
1L por 3L	9.755	1	9.7549	0.68819	0.428234
2L por 3L	5.719	1	5.7190	0.40346	0.541117

SQ = Soma dos Quadrados, GL= Graus de Liberdade, QM = Quadrado Médio; L = interação linear; Q = interação quadrática; R^2 (coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta) = 0,92

*Valores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p < 0,05$)

Na otimização com o substrato Avicel nas mesmas condições utilizadas no DCCR com EFB_t, o melhor resultado obtido após a sacarificação foi de 92 g/L de glicose. Em comparação com o substrato EFB_t a diminuição foi de 30% na concentração do produto final (glicose), lembrando que o substrato EFB_t continha nesta etapa 61,3% de celulose, cerca de 40% menos de celulose que o Avicel, que é

composto praticamente 100% de celulose. Um fato que também foi notado é que as condições da melhor resposta na otimização com Avicel, referentes ensaio 12 da TABELA 24, foram as mesmas encontradas para o DCCR de EFB_t, referente ao ensaio 12 da TABELA 28.

Em relação aos rendimentos tanto de conversão da celulose em glicose quanto da quantidade de glicose obtida por grama de substrato utilizado, as condições onde foram observados os melhores resultados ocorreram no ponto 6 no DCCR de ambos os substratos (Avicel e EFB_t), que se caracterizava por: 58,5h de hidrólise, com 7% (m/v) de substrato e 3,3% (v/v) de enzima Cellic CTec2. Os rendimentos de conversão da celulose presente foram altos em ambos os casos 91,8 e 100%. Em contraste com o rendimento de glicose obtida por grama de substrato que foram bem menores, 1176,4 e 691,0, para Avicel e EFB_t, respectivamente. Os altos rendimentos para a conversão da celulose é justificada pois leva em conta a quantidade real de celulose presente em cada substrato, por outro lado o rendimento por grama de substrato considera somente o peso da amostra e não a composição.

Para estudar a resposta final e os rendimentos a partir da quantidade real de celulose presente no substrato EFB_t com o substrato Avicel, o ensaio 12 foi reproduzido com a concentração de substrato relativa à quantidade de celulose presente no mesmo ensaio com EFB_t. Neste caso o EFB_t continha 61,3% de celulose. Como resultado, foi obtido 66,3 g/L de glicose no hidrolisado, um rendimento de 64,9% de conversão da celulose em glicose, e 720,7 mg de glicose obtida por 1 grama de Avicel. Assim, conclui-se que nestas mesmas condições ambos os substratos utilizados proporcionaram praticamente as mesmas respostas. O rendimento de obtenção de glicose por grama de substrato foi mais alto, uma vez que a quantidade de substrato puro utilizado é menor (150 g de EFB_t e 92 g para o Avicel), entretanto o rendimento de conversão de celulose em glicose foi praticamente igual, 64,9% (64,86% para o Avicel e 64,87 para o EFB_t), indicando que a enzima apresentou comportamento semelhante para os dois tipos de substrato.

Em comparação à sacarificação do EFB_t com as enzimas Celluclast 1.5L e Novozymes 188 os resultados foram semelhantes. A melhor concentração de glicose obtida foi de 65,4 g/L, no ensaio 14 da TABELA 26, próximo ao resultado alcançado com a enzima Cellic CTec2 64,9 g/L, ambos com a mesma concentração

de substrato 15% (m/v), mesmo tempo de hidrólise utilizado 38,9 h, e mesma concentração da enzima principal 2,2% (m/v). Entretanto, não houve necessidade do uso da enzima Novozymes 188, pois a enzima Cellic CTec 2 contém β -glicosidases. Assim, o uso da enzima Cellic CTec2 é mais viável para a sacarificação de EFB_i.

A enzima Cellic CTec2 foi usada para a sacarificação de substratos heterogêneos, e seus respectivos rendimentos de conversão da celulose em glicose: EFB - 83,9% (KIM e KIM, 2013); palha de milho – 48,8% (ZHANG, XU, e HANNA, 2012); palha de trigo - 52,9% (LÓPEZ-ABELAIRAS, LU-CHAU, e LEMA, 2013).

A otimização da sacarificação enzimática da palha de trigo pré-tratada com o fungo *Irpeex lacteus* e as enzimas Cellic CTec, HTec2, e NS50010 (β -glicosidase), aumentou o rendimento de conversão da celulose em glicose de 33 para 54%, e diminuiu a carga enzimática em 40% em relação às condições iniciais.

Pelo gráfico de Pareto (FIGURA 38) pode-se observar que os efeitos de todas as variáveis estudadas, tempo, concentração de EFB_i e de enzima Cellic CTec2, no termo linear são positivos. Os termos lineares apresentam sinal positivo, assim, qualquer aumento nos níveis destas variáveis a resposta final, concentração de glicose, também vai aumentar. Como os fatores não foram significativos no termo quadrático, o ponto ótimo não foi alcançado, assim, o gráfico de Pareto sugere que os níveis das variáveis aumentem para que o ponto ótimo seja encontrado. Entretanto, o aumento destes níveis não é viável economicamente e operacionalmente.

A concentração das enzimas é um fator importantíssimo pois o custo com enzimas é de 25-50% (ZHUANG *et al.*, 2007), assim a otimização ajuda a melhorar e reduzir os custos com a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos e consequentemente da produção de bioetanol (BERLIN *et al.*, 2007).

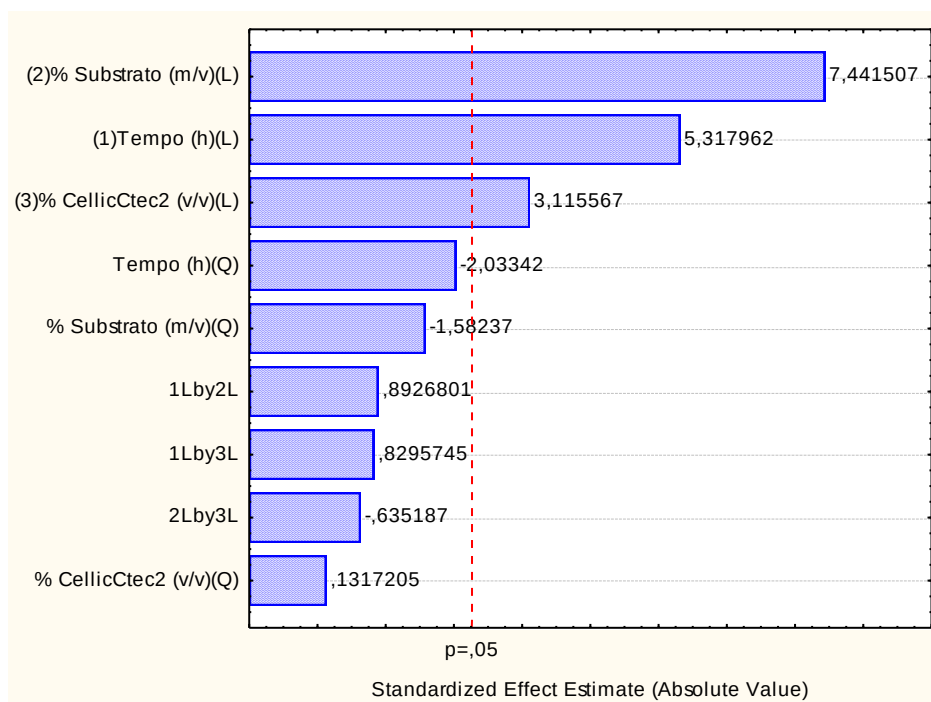


FIGURA 30 - GRÁFICO DE PARETO A PARTIR DO DCCR PARA A PRODUÇÃO DE GLICOSE DURANTE A SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE EFB_t COM A ENZIMA CELLIC CTEC 2

As superfícies de contorno geradas, FIGURA 39 A-B, mostram que a região ótima inicia com os maiores níveis de concentração de EFB_t (acima de 12%) e da enzima Cellic CTec2 (acima de 2,5%) em relação ao tempo de hidrólise (acima de 40h). A figura 26C mostra que para concentrações acima de 10% de EFB_t, qualquer concentração de enzima Cellic CTec2 atinge a resposta ótima, acima de 60 g/L de glicose. A otimização da sacarificação enzimática da cana-de-açúcar pré-tratada com ácido e base chegou a 58,4 g/L de glicose, através das variáveis: temperatura da reação (47°C), carga enzimática (25,9 FPU/g de substrato) e concentração de sólidos (10% m/v) (VÁSQUEZ *et al.*, 2007). A região ótima apresentada pela FIGURA 39 A-C variou entre 60-70 g/L. Estes valores mostram ser um exemplo de hidrolisado com potencial para produção de bioteno, pois os valores estão próximos aos 80 g/L de açúcares fermentescíveis (glicose) teoricamente necessários para uma produção de bioetanol de 40 g/L (YAN *et al.*, 2012).

Dados da literatura (Kim e Kim, 2013) mostram que a enzima Cellic CTec2 foi utilizada na sacarificação de EFB após pré-tratamento ácido-básico, com uma carga enzimática de 50 FPU/g de 10% biomassa (m/v), com 48h de reação, gerou 70,8

g/L de glicose. De acordo com os autores, a enzima Cellic CTec2 continha 84 FPU/ml, portanto em 10 gramas seriam 500 FPU/ml, o volume de tampão para 10 gramas seria 100 mL, logo 5% (v/v) de enzima. O resultado obtido por este estudo apesar de ser menor do que o obtido por estes autores, 64,85 g/L de glicose, é mais interessante, uma vez que os valores são muito próximos e alcançados em 9 horas a menos, e usando a metade da concentração da enzima Cellic CTec2. Outros autores também relatam uma produção nestas condições de 1,8 g/L de xilose, e em nosso estudo a xilose não foi detectada após as sacarificações em qualquer condição.

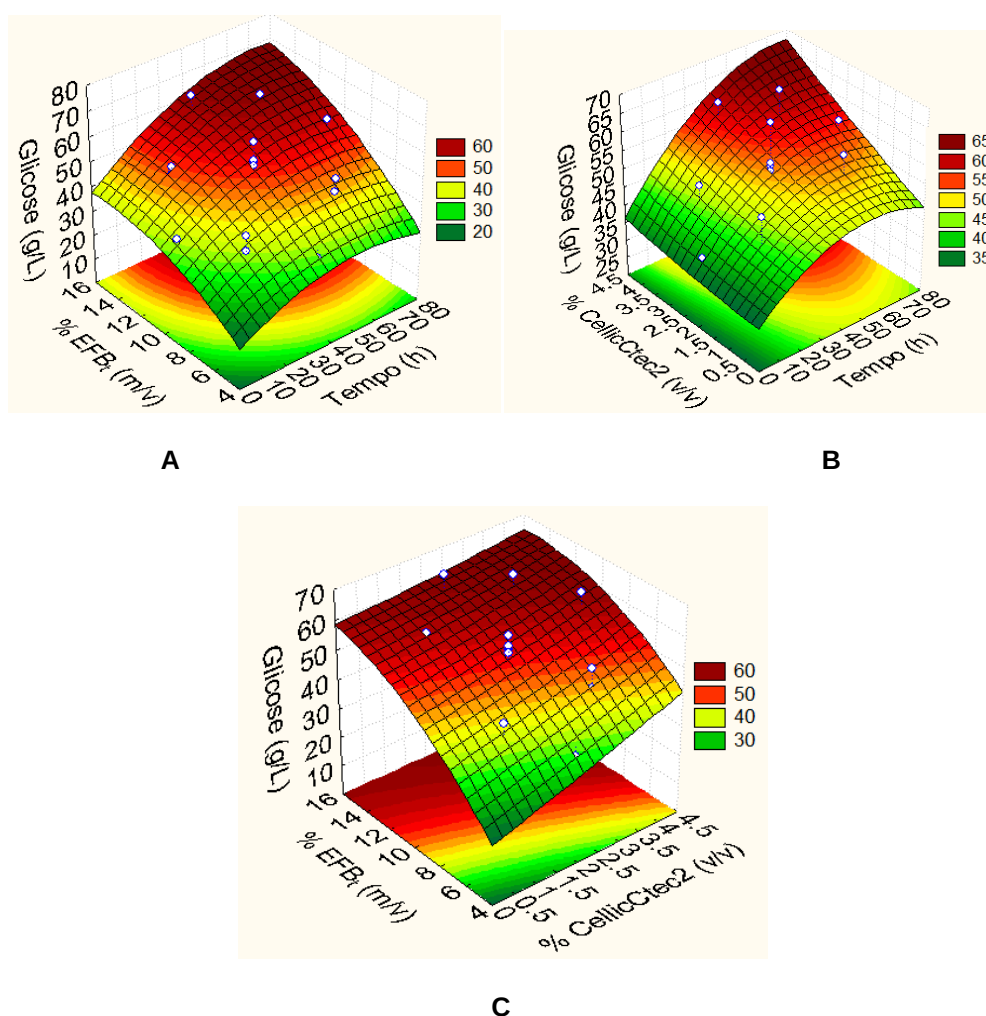


FIGURA 31 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO DCCR PARA A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE EM FUNÇÃO: A - DA CONCENTRAÇÃO DE EFB_t E DO TEMPO; B - DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA CELLIC CTEC 2 E DO TEMPO; C - DAS CONCENTRAÇÕES DE EFB_t E DE CELLIC CTEC2

A partir dos coeficientes de regressão do programa Statística 5 ® após a otimização com DCCR para a sacarificação de EDB_t com a enzima Cellic CTec2, foi gerado a seguinte Equação 12 que descreve as superfícies de contorno, para a concentração de glicose (g/L):

$$Z = -9,9280 + 0,36976*t - 0,00539*t^2 + 6,02193*EFB_t - 0,18261*EFB_t^2 + 3,12280*C + 0,12409*C^2 + 0,02044*t*EFB_t + 0,05428*t*C - 0,27430*EFB_t*C \text{ (Equação 12)}$$

Onde, Z = Glicose (g/L); t= Tempo de hidrólise (h); EFB_t= EFB pré-tratado com ácido e base (m/v); C = [Cellic CTec2] (v/v).

O tipo de pré-tratamento também é essencial à sacarificação enzimática, e pode aumentar os rendimentos do processo conforme for conduzido (MOOD *et al.*, 2013; JØRGENSEN, KRISTENSEN e FELBY, 2007). Portanto, para melhorar ainda mais nossos rendimentos, um estudo com outros pré-tratamentos seria interessante do ponto de vista em melhorar a quantidade de glicose após a sacarificação.

A próxima etapa do nosso estudo é o escalonamento destas condições encontradas com a sacarificação do EFB_t com a enzima Cellic CTec2 e espera-se chegar à um rendimento superior ao encontrado (432 mg de glicose/g de EFB_t).

4.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE EFB_t EM TANQUE AGITADO

Após a otimização da atividade enzimática com o substrato EFB_t, com o objetivo de aumentar em quantidade e qualidade do hidrolisado rico em glicose pra produção de bioetanol, a hidrólise enzimática foi conduzida em um tanque de hidrólise de 1L, visando o aumento de escala posterior.

No escalonamento foi utilizada a melhor condição do DCCR com EFB_t com a enzima Cellic CTec2, nas condições: 15% (m/v) EFB_t; 2,2% (v/v) de enzima Cellic CTec2 e tempo 38,9 h, em um volume útil de 500 mL.

Em um teste prévio foi observado que para esta concentração de sólidos 15%, não haveria condições operacionais com o equipamento utilizado devido à falta

de agitação homogênea. Portanto, a solução encontrada foi fazer a sacarificação em batelada alimentada de sólidos.

Estudos com batelada alimentada visam aumentar a quantidade de sólidos, e consequentemente, o rendimento de glicose final (KRISTENSEN, FELBY, e JØRGENSEN, 2009). Várias estratégias de batelada alimentada têm sido realizadas com o objetivo de aumentar a quantidade de substrato, sem atingir viscosidade em excesso e também sem tornar a ligação enzima-substrato improdutiva. Além disso, elevadas concentrações de substrato podem acarretar problema de transferência de calor e massa devido às propriedades reológicas de uma suspensão muito densa e fibrosa, proporcionando problemas difusionais para as enzimas (VERARDI *et al.*, 2012; RUDOLF *et al.*, 2005). O alto teor de sólidos em operação de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é motivado tanto pela diminuição de custos operacionais, quanto pelo aumento da concentração do produto e, consequentemente, os custos de separação (HODGE *et al.*, 2009).

Para que o escalonamento fosse possível em relação à solubilização do substrato no tampão e agitação por hélice naval, um teste prévio foi conduzido com a adição de 50% da massa total de EFB_t no início e o restante após metade do tempo total (19,5h) com o volume total de enzima inicial, e outro com a enzima sendo adicionada em duas metades como o mesmo procedimento do substrato. Na TABELA 30 é possível observar um resumo com resultados realizados em duplicata antes do escalonamento, dos testes realizados e após o escalonamento.

TABELA 30 - RESULTADOS DA SACARIFICAÇÃO ANTES DO ESCALONAMENTO, DOS TESTES COM BATELADA ALIMENTADA, E APÓS O ESCALONAMENTO

	ERLENMEYER			TANQUE AGITADO ESCALONAMENTO
	PONTO 12 TABELA 31	1/2 [SUBSTRATO]* E ENZIMA TOTAL	1/2 [SUBSTRATO]* E ½ [ENZIMA]	
Glicose	64,9	70,9	69,3	72,9
(g/L)	65,9	72,3	70,9	71,5
Média	65,4a	71,6b	70,1b	72,2b
	± 0,73	± 0,96	± 1,10	± 0,99

*Substrato = EFB_t

* Letras diferentes= apresentam diferença significativa (p<0,05)

Letras iguais= não apresentam diferença significativa (p>0,05)

O teste Tuckey não apresentou diferença significativa para o uso do substrato pela metade do tempo com o total de enzima, nem para o mesmo tratamento com o volume da enzima também dividido na metade do tempo total igualmente como o substrato. Em relação ao ponto 12 da TABELA 31 os testes apresentaram diferença significativa, entretanto mostraram maior rendimento em concentração de glicose (g/L). Portanto, o tratamento dividindo a massa de EFB_t inicial em duas metades, considerando uma metade no início da sacarificação e a outra após 19,5h e com volume total de enzima inicial foi escolhida para o escalonamento.

O resultado final do escalonamento 72,2 g/L nestas condições aumentou em 11,2% a concentração de glicose da condição inicial. Os rendimentos observados, a partir da média (72,2 g/L) de concentração de glicose no hidrolisado foram: 68,8% de conversão de celulose em glicose, sendo que este material continha 62,9% de celulose antes da sacarificação, e 481,2 mg de glicose obtida por grama de celulose.

Portanto, o escalonamento em batelada alimentada permitiu que as condições aplicadas em frascos de Erlenmeyer se reproduzissem e também houve um aumento da concentração final no hidrolisado, ainda que pouco expressivo.

4.7 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO EFB_t E DO AVICEL COM EXTRATO ENZIMÁTICO PRODUZIDO NO LPB

A análise dos açúcares mostrou que não houve produção de glicose pelas enzimas presentes no extrato enzimático para ambos os substratos, entretanto, houve produção de celobiose na concentração de 0,24 e 0,07 g/L para o Avicel e para o EFB_t respectivamente. O extrato enzimático não estava purificado e concentrado, o que pode justificar o baixo rendimento da hidrólise enzimática em celobiose. Para justificar apenas o aparecimento deste açúcar, pode-se entender que o extrato possui apenas celulases, endo e exo-celulases, não havendo assim a enzima β -glicosidase para realizar a quebra da celobiose em glicose, pois a hidrólise enzimática da celulose em glicose depende da sinergia destas três enzimas (BALAT, 2011; SÁNCHEZ, 2009 ; SARKAR *et al.*, 2012).

4.8 PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE EFBS

Dois tipos de micro-organismos descritos na literatura como produtores de etanol: *Saccharomyces cerevisiae* YB2293 e *Candida pelliculosa* CCT 7734 (foram testados para verificar a produção de etanol em meio sintético utilizando 50 g/L de glicose comercial (descrito em 3.2.15.4). As duas leveduras produziram etanol: 20,25 g/L para *Candida pelliculosa* CCT 7734 e 19,5 g/L para *Saccharomyces cerevisiae* (YB 2293). Os resultados foram semelhantes, entretanto a falta de estudos de fermentação de glicose para produção de etanol com a *Candida pelliculosa*, evidenciada pela TABELA 31, motivou o estudo com esta levedura. O gênero *Candida* é reportado como produtor de álcool à partir de xilose, um exemplo é a espécie *Candida shehatae* (DELGENES, MOLETTA, e NAVARRO, 1996). Martín e colaboradores (2010) utilizaram a *Candida tropicalis* NBRC 0618 para fermentar o hidrolisado proveniente de resíduos de oliveiras, obtendo não somente etanol (7,2 g de etanol por grama de substrato), como xilitol.

A principal vantagem da fermentação separada da sacarificação (SHF – *Separate Hydrolysis and Fermentation*) em relação à fermentação simultânea à sacarificação (SSF – *Simultaneous Saccharification and Fermentation*) é observada pelo fato de que as condições operacionais ótimas de cada etapa podem ser atendidas separadamente, já que são diferentes (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

TABELA 31 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE ETANOL OBTIDAS APÓS FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE EFB

MICRO-ORGANISMO	ETANOL (g/L)/ TIPO DE FERMENTAÇÃO	TEMPO (h)	REFERÊNCIAS
<i>Candida pelliculosa</i> (CCT 7734)	16,6 SHF	48	Este trabalho
<i>S. cerevisiae</i> (W303-1A)	37,8 SSF	60	KIM e KIM, 2013
<i>S. cerevisiae</i>	48,5 SSF	48	HAN <i>et al.</i> , 2011
<i>S. cerevisiae</i> (ATCC 24860)	10,3 SHF	72	KASSIM <i>et al.</i> , 2011
<i>S. cerevisiae</i> D5A (ATCC 200062)	18,6 SSF	96	JUNG <i>et al.</i> , 2011

Os resultados obtidos na fermentação em batelada do hidrolisado de EFBt rico em glicose podem ser observados na FIGURA 40. Quando houve a adição do inóculo no volume de 5 mL (10% v/v), a concentração inicial de açúcares de 50 g/L passou a ser de 45 g/L, sendo evidenciada pela concentração de glicose presente em zero h de fermentação, como mostra o gráfico.

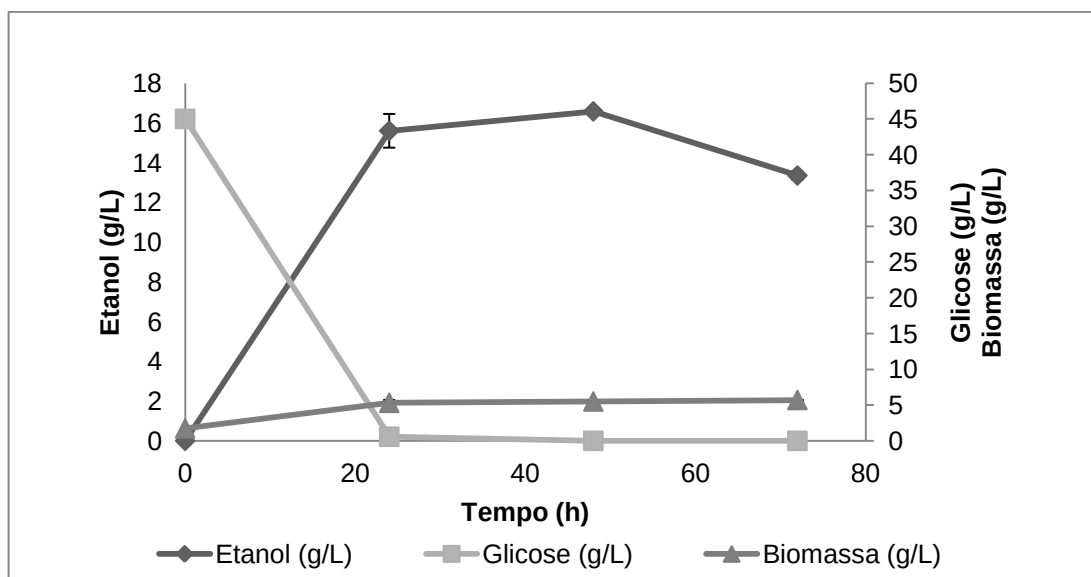


FIGURA 32 - FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE EFB PRÉ-TRATADO

O máximo de produção de etanol aconteceu entre 24 e 48 h, após este período a produção começou a cair. Diante dos dados da literatura, o resultado obtido é o melhor em SHF (16,6 g/L) de hidrolisado enzimático de EFB. Os rendimentos obtidos foram: 72,3% de conversão de glicose em etanol, sendo que o máximo teórico seria 23 g/L de etanol; 0,4 g de etanol por g de glicose. No estudo de Kim e Kim (2013) o rendimento chegou a 0,45 g de etanol por g de glicose, e de 0,11 g de etanol por grama de EFB_t. Jung e colaboradores (2011) chegaram a 0,1 g de etanol por grama de EFB tratado.

A concentração de glicose inicial foi consumida nas primeiras 24h de fermentação, como visto na FIGURA 40. Para tentar aumentar a quantidade de etanol produzido seria necessária a utilização de leveduras geneticamente modificadas para aguentar maiores concentrações de glicose, ou também realizando uma fermentação em batelada alimentada.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de um bioprocesso para a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduo lignocelulósico proveniente da indústria de processamento de óleo de palma para produção de biodiesel foi atingido com sucesso.

- Os resultados obtidos para a composição química do resíduo EFB pré-tratamento foram semelhantes a outros resultados disponíveis na literatura para esta biomassa proveniente de outros países. Através destes resultados foi possível observar um alto teor de celulose, que pôde ser utilizada para produção de etanol celulósico de segunda geração;

- O pré-tratamento ácido-básico foi eficiente na remoção da hemicelulose e lignina das fibras dos EFBs, e aumentou a disponibilidade da celulose que é um fator indispensável para o bom desempenho da produção de um hidrolisado enzimático rico em glicose, e sua posterior fermentação à bioetanol. Esta etapa gerou um substrato celulósico com 62,7% de celulose;

- As lavagens controladas das fibras de EFB após o pré-tratamento básico foram importantes para diminuir a quantidade de compostos fenólicos presentes, chegando a 0,01 mg/mL na sexta lavagem, e conseqüentemente para melhorar a condição para atuação da enzima nestas condições;

- As micrografias eletrônicas revelaram que o pré-tratamento ácido-básico deixou os poros da superfície da fibra de EFB livres de sílica, e que a estrutura recalcitrante do material foi desorganizada, facilitando assim o acesso das enzimas celulolíticas;

- Após as duas etapas de otimização realizadas com o substrato Avicel e as enzimas comerciais Celluclast 1.5L e Novozymes 188, a variável resposta aumentou de 87,3 g/L, em concentração de glicose presente no hidrolisado, na primeira etapa com planejamento fatorial incompleto, para 93,6 g/L na melhor condição escolhida para o DCCR. Um aumento de cerca de 7% na concentração final de glicose;

- Através das otimizações da hidrólise enzimática do substrato Avicel, os resultados mostraram que a enzima Cellic CTec2 produziu 92 g/L de glicose, diante

das seguintes condições: 15% (m/v) de substrato, 2,2% (v/v) de enzima e 38,9 h de hidrólise. Enquanto que a otimização da hidrólise deste substrato com o conjunto Celluclast 1.5L e Novozymes 188, gerou um hidrolisado com 93,6 g/L de glicose, diante das mesmas condições, entretanto houve necessidade de duas enzimas para se obter este efeito;

- O resultado das otimizações da hidrólise enzimática do substrato EFB após pré-tratamento ácido-básico com a enzima Cellic CTec2, gerou um hidrolisado com 64,9 g/L de glicose e 63,5% de rendimento. Nas seguintes condições: 15% (m/v) de EFB_t, 2,2% (v/v) de enzima e 38,9 h de hidrólise. A otimização da hidrólise enzimática do EFB_t com as enzimas Celluclast 1.5L e Novozymes 188, obteve resultado semelhante nas mesmas condições, entretanto houve necessidade de duas enzimas para se obter este efeito;

- As otimizações da enzima Celluclast 1.5L e Novozymes 188 para os substratos Avicel e EFB_t revelaram que as mesmas condições ótimas foram encontradas para ambos os substratos 15% (m/v) de substrato, 2,2% (v/v) de Celluclast 1.5L, 1% (v/v) de Novozymes 188 e 38,9 h de hidrólise. A diferença de 30% da resposta obtida em concentração de glicose: 93,6 e 65,4 g/L para o Avicel e EFB_t respectivamente, pode ser explicada pela diferença de 40% de concentração de celulose presente nos substratos;

- As otimizações da enzima Cellic CTec2 para os substratos Avicel e EFB_t revelaram que as mesmas condições ótimas foram encontradas para ambos os substratos 15% (m/v) de substrato, 2,2% (v/v) de Cellic CTec2 e 38,9 h de hidrólise. A diferença de 30% da resposta obtida em concentração de glicose: 92 e 64,9 g/L para o Avicel e EFB_t respectivamente, pode ser explicada pela diferença de 40% de concentração de celulose presente nos substratos;

- O escalonamento da melhor condição obtida com a otimização da hidrólise enzimática com o substrato EFB pré-tratado com ácido e base, proporcionou um hidrolisado com 72,2 g/L em glicose, e um aumento de 11,2% em relação ao ensaio em Erlenmeyer, na melhor condição encontrada para a enzima Cellic Ctec2;

- A fermentação do hidrolisado de EFB_t, obtido no escalonamento, em batelada, revelou uma produção de 16,6 g/L de etanol em 48 h e um rendimento máximo teórico de 72,3%.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados desse trabalho são importantes visto que na literatura há poucos estudos sobre a otimização da hidrólise enzimática do substrato Avicel e do EFB pré-tratado, e principalmente utilizando a enzima Cellic CTec2, como também não há relatos da obtenção de bioetanol celulósico a partir de EFB com a levedura *Candida pelliculosa*.

As seguintes sugestões para trabalhos futuros, perspectivas para a produção de bioetanol, e melhoramento das condições do processo como um todo deverão complementar a investigação iniciada com esta dissertação:

- Testar diferentes pré-tratamentos, sejam eles químicos, físicos e/ou biológicos, que possam aumentar a disponibilização da celulose, digestibilidade, e os rendimentos de hidrólise enzimática da celulose presente nos EFBs;
- Ampliação da escala do pré-tratamento em tanques com maior capacidade útil e também que possibilitem uma melhor mistura reacional;
- Validação dos modelos propostos para as otimizações realizadas, incluindo os dois substratos, Avicel e EFB pré-tratado, com as enzimas Cellulast 1.5L em conjunto com a Novozymes 188, e a Cellic CTec2;
- Continuar os estudos de hidrólise enzimática com o uso de enzimas produzidas e aumento da escala;
- Testar novas cepas de leveduras alcoogênicas e outros meios e condições de cultivo para aumentar os rendimentos de produção de bioetanol;
- Realizar fermentação em batelada alimentada de modo a prolongar a fermentação com pulso de glicose e, conseqüentemente, aumentar o rendimento em bioetanol;
- Ampliar a escala da produção de bioetanol.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL KHALIL, H. P. S.; SITI ALWANI, M.; RIDZUAN, R.; KAMARUDIN, H.; KHAIRUL, A. Chemical Composition, Morphological Characteristics, and Cell Wall Structure of Malaysian Oil Palm Fibers. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 47, n. 3, p. 273–280, 2008.

ABDULLAH, M. A.; NAZIR, M. S.; WAHJOEDI, B. A. Development of value-added Biomaterials from Oil Palm Agro-wastes. **2nd International Conference on Biotechnology and Food Science - IPCBEE**, v. 7, p.70–73, 2011.

ADEL, A. M.; ABD EL-WAHAB, Z. H.; IBRAHIM, A. A; AL-SHEMY, M. T. Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part I. Acid catalyzed hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 101, n. 12, p. 4446–55, 2010.

ABOISSA. **Óleo de Palma.** Disponível em: <<http://www.aboissa.com.br/produtos/view/609/oleo-de-palma.html>>. Acesso em: 24/02/2012.

AGUIAR, R. S.; SILVEIRA, M. H. L.; PITARELO, A. P.; CORAZZA, M. L.; RAMOS, L. P. Kinetics of enzyme-catalyzed hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 147, p. 416–23, 2013. Elsevier Ltd.

ALAM, Z.; MAMUN, A. A.; QUDSIEH, I. Y.; MUYIBI, S.A; SALLEH, H.M; NOR, M.O. Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 61–64, 2009.

ALFANI, F.; GALLIFUOCO, A.; SAPOROSI, A.; SPERA, A.; CANTARELLA, M. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 184–192, 2000.

ALMEIDA, R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82, p. 340–349, 2007.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–61, 2010.

AUGUSTO, S.; ALVES, O.; LEMOS, O. F. DE; GOMES, B.; LUÍS, A. In vitro embryo rescue of interspecific hybrids of oil palm (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, p. 1–6, 2011.

AWANG, M. R.; MUTAAT, H. H.; MAHMUD, M. S.; HUSSAIN, W.B.W.; OSMAN, T.; BAKAR, K. A.; KASSIN, A.; MAHMUD, Z. U. W.; MANAF, I.. Radiation pasteurised oil palm empty fruit bunch fermented with *Pleurotus sajor-caju* as feed supplement to ruminants. **Radiat. Phys. Chem**, v. 42, n. 4-6, p. 611–616, 1993.

AZIZ, A. A.; DAS, K.; HUSIN, M.; MOKHTAR, A. Effects of physical and chemical pre-treatments on xylose pre-treatments xylose and glucose production from oil palm press fibre. **Journal of oil palm research**, v. 14, n. 2, p. 10-17, 2002.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 5, p. 551–573, 2008.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. 2 ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 299 p, 1995.

BERLIN, A.; GILKES, N.; KURABI, A.; BURA, R.; TU, M.B.; KILBURN, D.; SADDLER, J. Weak lignin-binding enzymes-a novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 121, p. 163–170, 2005.

BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; SADDLER, J. Optimization of Enzyme Complexes for Lignocellulose Hydrolysis. **Biotechnology and bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 287–296, 2007.

BRASIL. Comissão de meio ambiente e desenvolvimento sustentável (CMADS). **Projeto de Lei 7.326 de 2010**. Dispõe sobre a criação do Programa de Produção Sustentável da Palma de Óleo no Brasil, estabelece diretrizes para o zoneamento agroecológico para a cultura de palma de óleo, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=477167>. Acesso em: 23/02/2014.

BRASIL. ABRAPALMA (Associação Brasileira dos Produtores de óleo de Palma). Óleo de Palma: análises dos investimentos feitos, as dificuldades enfrentadas, as conquistas e os resultados já alcançados. 9º Biodiesel congress, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Produção e Agroenergia. **Anuário estatístico de agroenergia 2012: statistical yearbook of agrienergy** Bilíngüe, p. 284. Brasília, D.F., 2013.

BRASIL. MDA - Ministério do Desenvolvimento Agrário. **Viabilidade da Extração do Óleo de Dendê no Estado do Pará**. Viçosa, M.G., 2007.

BUCKERIDGE, M. S, SANTOS W.D,SOUZA, A.P ; As Rotas para o Etanol Celulósico no Brasil. Departamento de Botânica – IBUSP, Cidade Universitária - Butantã ,São Paulo,2007.

CANILHA, L.; KUMAR CHANDEL, A.; DOS SANTOS MILESSI, T. S.; FERNANDES ANTUNES, F. A.; da COSTA FREITAS, W. L.; das GRAÇAS ALMEIDA FELIPE, M.; da SILVA, S.S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2012, p. 989572, 2012.

CHANG, Y.-H.; CHANG, K.-S.; HUANG, C.-W.; HSU, C.-L.; JANG, H.-D. Comparison of batch and fed-batch fermentations using corncob hydrolysate for bioethanol production. **Fuel**, v. 97, p. 166–173, 2012.

CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, n. 2, p. 85–89, 2007.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 3, p. 220–225, 1996.

DIAS, M. O. S.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROCHA, G.JM.; PRADELLA, J.G.C.; ROSSEL, C.E.V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Second generation ethanol in Brazil: can it compete with electricity production? **Bioresource technology**, v. 102, n. 19, p. 8964–71, 2011.

DING, S.-Y.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 3, p. 597–606, 2006.

EL-ZAWAWY, W. K.; IBRAHIM, M. M.; ABDEL-FATTAH, Y. R.; SOLIMAN, N. A.; MAHMOUD, M. M. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 865–871, 2011.

FENGEL, D.; WEGENER G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERNANDO, S.; ADHIKARI, S.; CHANDRAPAL, C.; MURALI, N. Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction. **Energy & Fuels**, v. 20, n. 4, p. 1727–1737, 2006.

FUENTES, L. L. G.; RABELO, S. C.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. Kinetics of lime pretreatment of sugarcane bagasse to enhance enzymatic hydrolysis. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 163, n. 5, p. 612–25, 2011.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 1, p. 78–88, 2006.

GHAZALI, A.; WAN ROSLI, W. D. W. A. N.; LAW, K. N. PRE-TREATMENT OF OIL PALM BIOMASS FOR ALKALINE PEROXIDE PULPING. **CELLULOSE CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**, v. 43, p. 331–338, 2009.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. *Pure Appl. Chem.*, v.59, n.2, p. 257-268, 1987.

GIESE, E. C.; PIEROZZI, M.; DUSSÁN, K. J.; CHANDEL, A. K.; DA SILVA, S. S. Enzymatic saccharification of acid-alkali pretreated sugarcane bagasse using commercial enzyme preparations. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 7, p. 1266–1272, 2013.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; MARQUES, S. BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–800, 2010.

GRAY, K. A; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current opinion in chemical biology**, v. 10, n. 2, p. 141–6, 2006.

HAMELINCK, C. N. .; HOOIJDONK, G. VAN;; FAALJI, A. P. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 384–409, 2005.

HAMZAH, F.; IDRIS, A.; SHUAN, T. K. Preliminary study on enzymatic hydrolysis of treated oil palm (Elaeis) empty fruit bunches fibre (EFB) by using combination of cellulase and β 1-4 glucosidase. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 3, p. 1055–1059, 2011.

HAN, L.; FENG, J.; ZHANG, S.; MA, Z.; WANG, Y.; ZHANG, X. ALKALI PRETREATED OF WHEAT STRAW AND ITS ENZYMIC HYDROLYSIS. **Brasilian Journal of Microbiology**, p. 53–61, 2012.

HAN, M.; KIM, Y.; KIM, W.; CHOI, G. High efficiency bioethanol production from OPEFB using pilot pretreatment reactor. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 86, n. January, p. 1527–1534, 2011.

HASSAN, O.; LING, T. P.; MASKATA, M. Y.; ROSLI, Md. I.; BADRI, K; JAHIM, J.; MAHADI, N.M. Optimization of pretreatments for the hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber (EFBF) using enzyme mixtures. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, n. 0, p. 137–146, 2013.

HAstrup, A. C. S.; HOWELL, C.; LARSEN, F. H.; SATHITSUKSANOH, N.; GOODELL, B.; JELLISON, J. Differences in crystalline cellulose modification due to degradation by brown and white rot fungi. **Fungal biology**, v. 116, n. 10, p. 1052–63, 2012.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 100, n. 1, p. 10–8, 2009.

HILDÉN, L.; JOHANSSON, G. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. **Biotechnology letters**, v. 26, n. 22, p. 1683–93, 2004.

HODGE, D. B.; KARIM, M. N.; SCHELL, D. J.; MCMILLAN, J. D. Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 152, n. 1, p. 88–107, 2009.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; L, J. V. R. E.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 602–619, 2003.

HSU, T.-C.; GUO, G.-L.; CHEN, W.-H.; HWANG, W.-S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4907–13, 2010.

IOELOVICH, M. ; MORAG, E. STUDY OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF PRETREATED BIOMASS AT INCREASED SOLIDS LOADING. **Bioresource**, v. 7, n. 4, p. 4672–4682, 2012.

ISROI; ISHOLA, M. M.; MILLATI, R.; SYAMSIAH, S.; CAHYANTO, M. N.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M.J. Structural changes of oil palm empty fruit bunch (OPEFB) after fungal and phosphoric acid pretreatment. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14995–5002, 2012.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. **Advances in applied microbiology**, v. 47, p. 221–68, 2000.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.1, p. 119–134, 2007.

JUNG, Y. H.; KIM, I. J.; HAN, J.; CHOI, I.; KIM, K. H. Bioresource Technology Aqueous ammonia pretreatment of oil palm empty fruit bunches for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9806–9809, 2011.

KASSIM, M. A. .; KHEANG, L. S. .; BAKAR, N. A. .; AZIZ, A. A. .; SOM, R. M. . Bioethanol Production from Enzymatically Saccharified Empty Fruit Bunches Hydrolysate using *Saccharomyces cerevisiae*. **Research Journal of environmental Sciences**, v. 5, n. 6, p. 573–586, 2011.

KHADIJAH HANIM, A. R.; SITI JAMILAH HANIM, M. Y.; Z., ZARINA, Z. Bioprotein Production from Oil Palm Empty Fruit Bunch by *Aspergillus Niger*. **2nd International Conference on Environment Science and Biotechnology-IPCBEE International Proceedings of Chemical, Biological & Environmenta**, p. 104–108, 2012.

KIM, S.; KIM, C. H. Bioethanol production using the sequential acid/alkali-pretreated empty palm fruit bunch fiber. **Renewable Energy**, v. 54, p. 150–155, 2013.

KIM, S.; MIN, J.; SEO, J.; HO, C. Bioresource Technology Sequential acid- / alkali-pretreatment of empty palm fruit bunch fiber. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 229–233, 2012.

KIM, Y.; XIMENES, E.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme and microbial technology**, v. 48, n. 4-5, p. 408–15, 2011.

KRISTENSEN, J. B.; BÖRJESSON, J.; BRUUN, M. H.; TJERNELD, F.; JØRGENSEN, H. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 888–895, 2007.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for biofuels**, v. 2, n. 1, p. 11, 2009.

KRISHNA, H. S.; SEKHAR RAO, K. C.; SURESH BABU, J.; SRIRAMI REDDY, D. Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM-9414. **Bioprocess Engineering**, v. 22, n. 5, p. 467–470, 2000.

LAN, T. Q.; LOU, H.; ZHU, J. Y. Enzymatic Saccharification of Lignocelluloses Should be Conducted at Elevated pH 5.2–6.2. **BioEnergy Research**, v. 6, n. 2, p. 476–485, 2012.

LARSSON, P. T.; WICKHOLM, K.; IVERSEN, T. A CP / MAS 13C NMR investigation of molecular ordering in celluloses. **Carbohydrate research**, v. 302, p. 19–25, 1997.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 121/124, p. 1081–1099, 2005.

LAW, K.-N.; DAUD, W. R. W.; GHAZALI, A. morphological and chemical nature of fiber strands of oil palm empty-fruit-bunch (opefb). *Bioresources* , v. 2, n. 3, p. 351–362, 2007.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012.

LÓPEZ-ABELAIRAS, M.; LU-CHAU, T. A; LEMA, J. M. Enhanced saccharification of biologically pretreated wheat straw for ethanol production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 169, n. 4, p. 1147–59, 2013.

MANSFIELD, S.; MOONEY, C.; SADDLER, J. Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. **Biotechnology progress**, v. 15, n. 5, p. 804–816, 1999.

MARTÍN, J. F. G.; CUEVAS, M.; BRAVO, V.; SÁNCHEZ, S. Ethanol production from olive prunings by autohydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*. **Renewable Energy**, v. 35, n. 7, p. 1602–1608, 2010.

MATTHEWS, J. F.; SKOPEC, C. E.; MASON, P. E.; ZUCCATO, P.; TORGET, R.W.; SUGIYAMA, J.; HIMMEL, M.R.; BRADYA, J.W. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose I β . **Carbohydrate research**, v. 341, n. 1, p. 138–52, 2006.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 96, n. 6, p. 673–86, 2005.

MOOD, S.H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G.S.; NAJAFIC, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 124–129, 2008.

NOVOZYMES. **Novozymes Cellic® CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic**. Disponível em: <http://bioenergy.novozymes.com/en/cellulosic-ethanol/CellicCTec3/Documents/AS_2010-01668-03.pdf>. Acesso em: 17/11/2013.

OLIVEIRA, G. S.; ULHOA, C. J.; SILVEIRA, M. H. L.; ANDREAUS, J.; SILVA-PEREIRA, I.; POÇAS-FONSECA, M.J.; FARIA, F.P. An alkaline thermostable recombinant *Humicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase presents bifunctional (endo/exoglucanase) activity on cellulosic substrates. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 19–26, 2013.

OUYANG, J.; DONG, Z.; SONG, X.; LEE, X.; CHEN, M.; YONG, Q. Improved enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose (Avicel PH101) by polyethylene glycol addition. **Bioresource technology**, v. 101, n. 17, p. 6685–91, 2010.

PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 121-124, n. 3, p. 1069–79, 2005.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53–63, 2002.

PITARELO, A. P.; da SILVA, T. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; RAMOS, L. P. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1502–1509, 2012.

PURWANDARI, F. A.; SANJAYA, A. P.; MILLATI, R.; CAHYANTO, M.N.; HORVÁTH, I. S.; NIKLASSON, C; TAHERZADEH, M.J. Pretreatment of oil palm empty fruit bunch (OPEFB) by N-methylmorpholine-N-oxide (NMMO) for biogas production: Structural changes and digestion improvement. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 461–466, 2013.

RAMOS, L. P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro- industriais. Seminário Nacional sobre Reuso/Reciclagens de Resíduos Sólidos Industriais. Fonte: Curitiba, UFPR, 2000.

RASHID, S. S.; ALAM, Z.; KARIM, M. I. A.; SALLEH, M. H. Development of pretreatment of empty fruit bunches for enhanced enzymatic saccharification. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 81, p. 18728–18738, 2011.

RODRIGUES, M. I e IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**: Uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1ª. Ed.-Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

RUDOLF, A.; ALKASRAWI, M.; ZACCHI, G.; LIDÉN, G. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 195–204, 2005.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–91, 2003.

SAKAI, S.; TSUCHIDA, Y.; OKINO, S.; ICHIHASHI, O.; KAWAGUCHI, H.; WATANABE, T.; INUI, M.; YUKAWA, H. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum* R. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 7, p. 2349–53, 2007.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 185–94, 2009.

SÁNCHEZ, O. J; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource technology**, v. 99, p. 5270–5295, 2008.

SANTOS, V. T. O.; ESTEVES, P. J.; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W. Characterization of commercial cellulases and their use in the saccharification of a sugarcane bagasse sample pretreated with dilute sulfuric acid. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1089–98, 2011.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19–27, 2012.

SHAMSUDIN, S.; MD SHAH, U. K.; ZAINUDIN, H.; et al. Effect of steam pretreatment on oil palm empty fruit bunch for the production of sugars. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, p. 280–288, 2012.

SHAHRIARINOUR, M.; WAHAB, M. N. A.; MUSTAFA, S.; MOHAMAD, R.; ARIFF, A. B. Effect of various pretreatments of oil palm empty fruit bunch fibers for subsequent use as substrate on the performance of cellulase production by *Aspergillus terreus*. **Bioresource**, v.6, n.1, p.291-307, 2011.

SHEEHAN J.; HIMMEL M. Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the U.S. department of energy's research and development activities for bioethanol. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 817–827, 1999.

SHUIT, S. H.; TAN, K. T.; LEE, K. T.; KAMARUDDIN, A. H. Oil palm biomass as a sustainable energy source: A Malaysian case study. **Energy**, v. 34, n. 9, p. 1225–1235, 2009.

SILVEIRA, M. H. L.; RAU, M.; PINTO DA SILVA BON, E.; ANDREAUS, J. A simple and fast method for the determination of endo- and exo-cellulase activity in cellulase preparations using filter paper. **Enzyme and microbial technology**, v. 51, n. 5, p. 280–5, 2012.

SILVERSTEIN, R. A; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BOYETTE, M. D.; OSBORNE, J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource technology**, v. 98, n. 16, p. 3000–11, 2007.

SIMS, R. E. H.; MABEE, W.; SADDLER, J. N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource technology**, v. 101, n. 6, p. 1570–80, 2010. Elsevier Ltd.

SINGLETON, V.L., ROSSI JR. J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Vitic**, v. 16, p.144-158, 1965.

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

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. de SOUZA; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M; RAMOS, L.P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; . GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; da SILVA BON, E. P.; de MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. de Amorin.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4820–5, 2010.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. Principles of Fermentation Technology. Second Edition. Butterworth Heinemann, **Elsevier Science**, 357 p, 1995.

STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; MARINA, L.; MARIA, F. A.; BON, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol : Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 918–926, 2008.

SUMATHI, S.; CHAI, S. P.; MOHAMED, A. R. Utilization of oil palm as a source of renewable energy in Malaysia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 12, n. 9, p. 2404–2421, 2008.

SUN, R.; TOMKINSON, J. Fractional separation and physico-chemical analysis of lignins from the black liquor of oil palm trunk fibre pulping. **Separation and Purification Technology**, v. 24, p. 529–539, 2001.

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

TABI, A. N. M.; ZAKIL, F. A.; FAUZAN, W.N.; FAUZAI, M.; ALI, N.; HASSAN, O. The usage of empty fruit bunch (efb) and palm pressed fibre (ppf) as substrates for the cultivation of pleurotus ostreatus. **Jurnal Teknologi**, v. 49, p. 189–196, 2008.

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.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, p. 1621-1651, 2008.

TAN, H. T.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Second-generation bio-ethanol (SGB) from Malaysian palm empty fruit bunch: energy and exergy analyses. **Bioresource technology**, v. 101, n. 14, p. 5719–27, 2010.

TANIGUCHI, M.; TAKAHASHI, D.; WATANABE, D.; et al. Effect of steam explosion pretreatment on treatment with Pleurotus ostreatus for the enzymatic hydrolysis of rice straw. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 110, n. 4, p. 449–52, 2010.

TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Biotechnology progress**, v. 17, n. 1, p. 110–7, 2001.

TORRES, K.; MORALES, M. **A - Palmas oleaginosas de Colombia**, 2012. Disponível em: <<http://palmasoleaginosasdecolombia.blogspot.com.br/2012/03/la-palma-aceitera-tambien-llamada-palma.html>> . Acesso em: 24/02/2014.

TORRES, K.; MORALES, M. **B - Palmas oleaginosas de Colombia**, 2012. Disponível em: <<http://palmasoleaginosasdecolombia.blogspot.com.br/2012/03/el-procesamiento-de-los-frutos-de-la.html>> . Acesso em: 24/02/2014.

UFFEN, R. L. Xylan Degradation: a glimpse at microbial diversity. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 19, p. 1–6, 1997.

VAN SOEST, P. J.; Wine, R. H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. **IV Determination of plant cell-wall constituents**, 1967.

VAN SOEST, P.J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forage. **J. Anim. Sci.**, v.26, n.1, p. 119-120, 1967.

VARROT, A.; HASTRUP, S.; SCHU, M.; DAVIES, G. J. resolution. **Biochemical Journal**, v. 304, p. 297–304, 1999.

VÁSQUEZ, M. P.; DA SILCA, J. N. C. .; DE SOUZA JR., M. B. .; PEREIRA JR., N. . Enzymatic Hydrolysis Optimization to Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 07, n. 136-140, p. 141–154, 2007.

VERARDI, A.; BARI, I. DE; RICCA, E.; CALABRÒ, V. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. Prof. Marco Aurelio Pinheiro Lima (Ed.), ISBN: 978-953-51-0008-9, **InTech**, 2012.

WANG, M.; WU, M.; HUO, H. Life-cycle energy and greenhouse gas emission impacts of different corn ethanol plant types. **Environmental Research Letters**, v. 2, n. 2, p. 024001, 2007.

WILLKE, T.; VORLOP, K.-D. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 66, n. 2, p. 131–42, 2004.

WOOD, T. M.; SADDLER, J. N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 3–11, 1988.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M.R.; LEE, Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource technology**, v. 96, n. 18, p. 1959–66, 2005.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3-4, p. 170–176, 2010.

YAN, S.; YAO, J.; YAO, L.; ZHI, Z.; CHEN, X. Fed Batch Enzymatic Saccharification of Food Waste Improves the Sugar Concentration in the Hydrolysates and Eventually the Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* H058. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 2, p. 183–192, 2012.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and bioengineering**, v. 86, n. 1, p. 88–95, 2004.

YEH, A.-I.; HUANG, Y.-C.; CHEN, S. H. Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 192–199, 2010.

YI, J.; HE, T.; JIANG, Z.; LI, J.; HU, C. AlCl₃ catalyzed conversion of hemicellulose in corn stover. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 34, n. 11, p. 2146–2152, 2013.

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some Recent Advances in Hydrolysis of Biomass in Hot-Compressed Water and Its Comparisons with Other Hydrolysis Methods. **Energy & Fuels**, v. 22, p. 46–60, 2008.

ZHANG, S.; XU, Y.; HANNA, M. A. Pretreatment of corn stover with twin-screw extrusion followed by enzymatic saccharification. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 458–69, 2012.

ZHANG, Y.-H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 367–375, 2008.

ZHANG, Y.-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797–824, 2004.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 2, n. 3, p. 51–68, 2009.

ZHUANG, J.; MARCHANT, M. A.; NOKES, S. E.; STROBEL, H. J. Economic Analysis of Cellulase Production Methods for Bio-Ethanol. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 23, n. 5, p. 679–687, 2007.

APÊNDICE I

Os tempos de retenção e as áreas dos padrões utilizados de um dos cromatogramas utilizados estão na TABELA 32 a seguir:

TABELA 32 - TEMPOS DE RETENÇÃO E ÁREAS DE CADA PADRÃO UTILIZADO NA CLAE

	Celobiose	Glicose	Xilose	Arabinose	Álcool
Tempo de retenção (min)	7,9	9,8	10,5	11,53	23,8
Área (1g/L)	284886	241530	263099	270502	68603
Área (2g/L)	539335	457658	520360	541752	148776

APÊNDICE II

Para construção de uma curva padrão, amostras com concentrações conhecidas de glicose foram preparadas e após aplicação do método DNS, lidas espectrofotometricamente no comprimento de onda de 540 nm.

Partiu-se de uma solução estoque de glicose 10,0 mg/mL, preparada em tampão citrato 0,05 mol/L, sendo realizada diluições de 0 a 10,0 mg/mL. As reações com DNS foram realizadas adicionando em cada tubo de ensaio 1,0 mL de tampão citrato e 0,5 mL de cada uma das diluições de glicose previamente diluídas em tampão citrato. Foi adicionado aos tubos 3,0 mL do reagente DNS. Os tubos foram fervidos por 5 minutos a 100°C e posteriormente resfriados.

Vale ressaltar que ao preparar um novo reagente DNS, uma nova curva-padrão era construída.

A TABELA 33 traz as concentrações utilizadas para a construção da curva padrão

VOLUME DE SE (mL)	VOLUME DE TAMPÃO CITRATO 0,05M, pH 4,8 (mL)	Volume da solução diluída (mL)	[GLICOSE] final (mg/mL)
1,0	1,0	0,5	3,35
1,0	2,0	0,5	2,5
1,0	4,0	0,5	1,65
1,0	5,0	0,5	1,0

Com os dados obtidos pela leitura da absorbância da curva padrão de glicose, foi possível traçar um gráfico linear da concentração de glicose em função da absorbância, obtendo assim uma equação que relaciona as duas grandezas. A FIGURA 41 é um exemplo de gráfico e equação gerados por uma curva padrão.

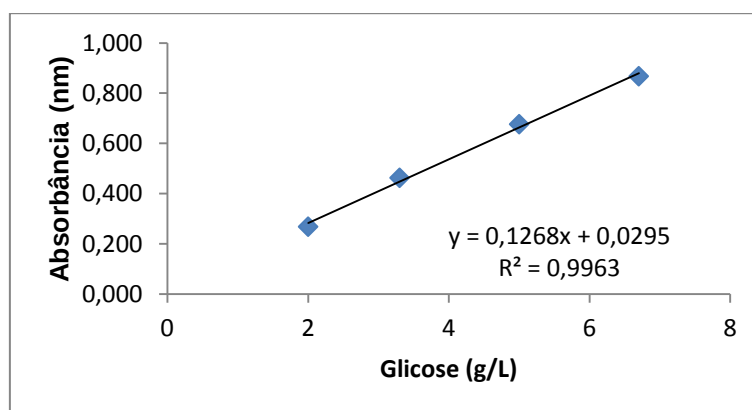


FIGURA 33 – GRÁFICO RELACIONADO A ABSORBÂNCIA (NM) E A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (G/L)

APÊNDICE III

Atividade Celulolítica

Segundo GHOSE (1987), uma unidade da atividade de enzima celulase (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente, isto é, 2,0/0,18016 μ mol de 50 mg de papel de filtro por 0,5 mL de enzima diluída durante 60 minutos de reação. A liberação de glicose em função da concentração de enzima pode ser observada na FIGURA 42 e 43, além disso, com as respectivas equações de reta obtidas, a partir da triplicata das análises em cada diluição, foi possível determinar a concentração de enzima necessária a liberação de exatamente 2,0 mg de glicose (para as enzimas Cellic CTec2 e Celluclast 1.5L respectivamente):

Cellic CTec2

$$\begin{aligned}\text{Log [enzima]} &= (2-10,09)/3,0023 \\ \text{Log [enzima]} &= -2,6946 \\ [\text{enzima}] &= 2,02 \times 10^{-3}\end{aligned}$$

$$\text{Atividade da enzima Cellic CTec2} = \frac{0,37}{1,97 \cdot 10^{-3}} = 187,82 \text{ FPU/mL}$$

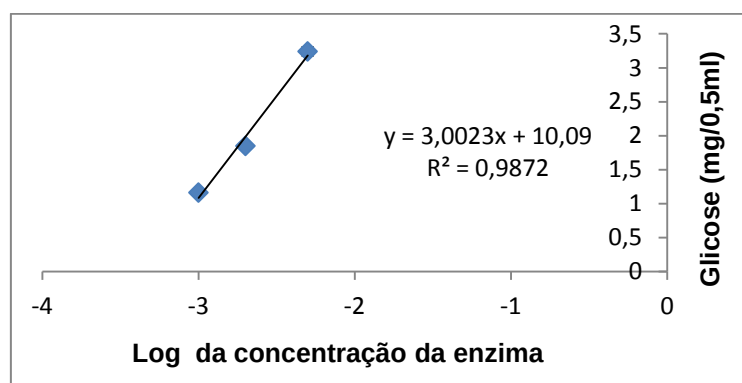


FIGURA 34 - COMPORTAMENTO DA ENZIMA CELLIC CTEC 2

Celluclast 1.5L

$$\begin{aligned}\text{Log [enzima]} &= (2-8,1429)/3,0153 \\ \text{Log [enzima]} &= -2,0374 \\ [\text{enzima}] &= 9,18 \times 10^{-3}\end{aligned}$$

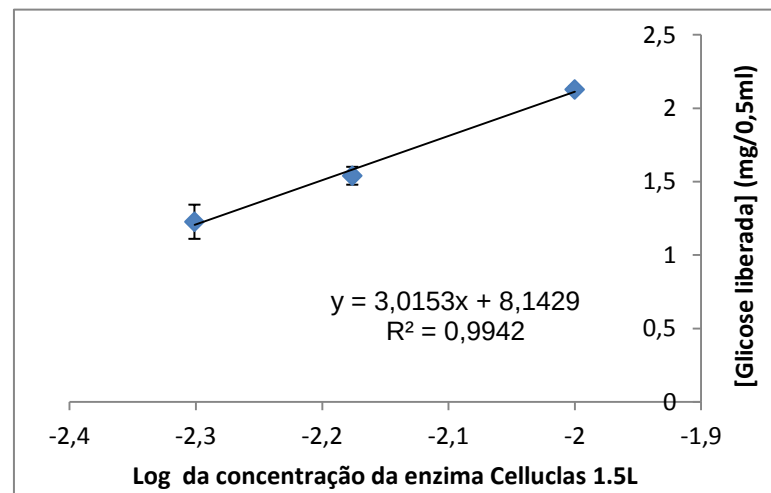


FIGURA 35 - COMPORTAMENTO DA ENZIMA CELLUCLAT 1.5L

$$\text{Atividade da enzima Celluclast 1.5L} = \frac{0,37}{9,18 \cdot 10^{-3}} = 40,3 \text{ FPU/mL}$$

APÊNDICE IV

Atividade de β -glicosidases/celobiase

As atividades de β -glicosidase das duas enzimas foram feitas em U/mL de acordo com a metodologia 2.8, para as enzimas Novozymes 188 e Cellic CTec2,

Segundo GHOSE (1987), uma unidade da atividade de β -glicosidase (CBU) baseia-se na liberação de exatamente 1,0 mg de glicose, isto é, 0,5/0,18016 μ mol de celobiose convertida por 1,0 mL de enzima diluída em 30 minutos de reação.

Novozymes 188

Para a enzima Novozymes 188 uma diluição de 1:3000 foi feita para o cálculo:

$$\text{Atividade da enzima Novozymes 188} = 3,26 \cdot 0,0926 = 905,8 \text{ U/mL}$$

Cellic CTec2

Para a enzima Cellic CTec2 uma diluição de 1:3000 foi feita para o cálculo:

$$\text{Atividade da enzima Cellic CTec2} = 2,89 \cdot 0,0926 = 802,84 \text{ U/mL}$$