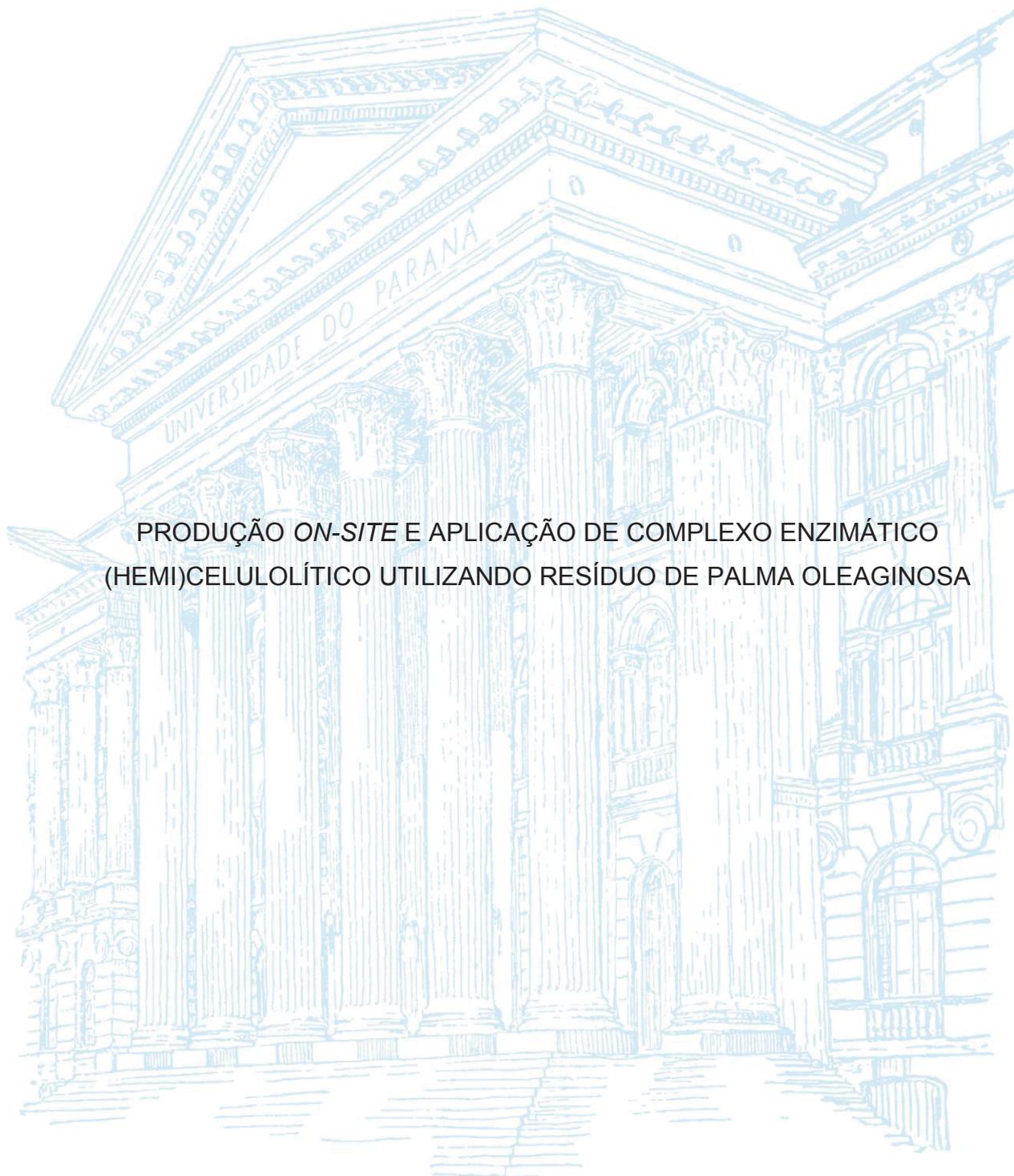


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOYCE GUEIROS WANDERLEY SIQUEIRA



PRODUÇÃO *ON-SITE* E APLICAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO
(HEMI)CELULOLÍTICO UTILIZANDO RESÍDUO DE PALMA OLEAGINOSA

CURITIBA

2019

JOYCE GUEIROS WANDERLEY SIQUEIRA

PRODUÇÃO *ON-SITE* E APLICAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO
(HEMI)CELULOLÍTICO UTILIZANDO RESÍDUO DE PALMA OLEAGINOSA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Luciana Porto de Souza
Vandenberghe

Co-orientadora: Cristine Rodrigues

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR

Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S618p Siqueira, Joyce Gueiros Wanderley
Produção *on-site* e aplicação de complexo enzimático (HEMI)celulolítico utilizando resíduo de palma oleaginosa [recurso eletrônico] / Joyce Gueiros Wanderley Siqueira – Curitiba, 2019.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia ,
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia.

Orientadora: Luciana Porto de Souza Vandenberghe
Co-orientadora: Cristine Rodrigues

1. Biomassa lignocelulósica. 2. Biocombustíveis. 3. Etanol. I.
Universidade Federal do Paraná. II. Vandenberghe, Luciana Porto
de Souza. III. Rodrigues, Cristine. IV. Título.

CDD: 665.37

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JOYCE GUEIROS WANDERLEY SIQUEIRA** intitulada: **Produção on-site e aplicação de complexo enzimático (hemi) celulolítico utilizando resíduo da palma oleaginosa**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 01 de Março de 2019.

LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

CRISTINE RODRIGUES

Coorientador - Avaliador Externo (UFPR)

MARCELA CÂNDIDO CÂMARA

Avaliador Externo (UFPR)

GISELLE MARIA MACIEL

Avaliador Externo (UFPR)

Para meus anjos da guarda, Larissa e Júlia, que, cada uma à sua maneira, foram minha força motriz para permanecer de pé nesse e em outros caminhos. E para meus pais Vanda e Josa, que são fonte inesgotável de amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, na pessoa do corpo docente, pelo acolhimento, apoio e ensinamentos dados nos quatro anos de estudo e pesquisa; e à CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço à professora Cristine Rodrigues, cujos conselhos e suporte diários me auxiliaram a não submergir no oceano obscuro da insanidade; além, é claro, do conhecimento científico e tecnológico que me transmitiu e que resultaram neste trabalho. Profunda gratidão também à professora Luciana Vandenberghe, pelo apoio diário e acompanhamento do desenvolvimento das atividades.

Aos meus pais, que têm me motivado a seguir meus sonhos e apoiado na realização deles. À minha irmã Larissa, que não me deixou fraquejar em nenhum momento. À Pluma, por sempre me trazer amor e conforto, me ajudando a seguir em frente, mesmo quando isso parecia quase impossível.

Ao Erickson, que esteve do meu lado em todas as etapas de realização deste trabalho e cuidou de mim nos momentos mais difíceis. Quando tudo parecia impossível ou inalcançável, quando eu parecia me perder, sempre pude contar com ele para me trazer de volta ou me mostrar que sempre existe um jeito.

Às minhas amigas da pós-graduação Juliana Santana e Priscilla Zwiercheczewski, cuja parceria e amizade sei que levarei para a vida inteira. Sou grata ao universo por ter posto amigas tão maravilhosas no meu caminho.

À Anna Beatriz, a estagiária mais dedicada, inteligente e prestativa que eu poderia ter, e cujo apoio foi primordial para o desenvolvimento desse trabalho. Com certeza é mais uma amiga que levarei para a vida. À Letícia Bassai, também estagiária que se tornou uma amiga, pelo apoio e amizade durante o convívio no laboratório.

Meu muito obrigada também aos técnicos do laboratório, sempre dispostos a ajudar, com destaque para o Otacílio, que recebia minhas ligações desesperadas aos domingos, à Mitiyo, sempre prestativa e com seu conhecimento único de cada

canto do laboratório e à Natascha, que auxiliou até mesmo passando conhecimento da sua vivência acadêmica.

Por fim, aos colegas de laboratório Marcela, Nelson, Paulo, Luis Pérez, Anderson, Débora e Matheus, por toda a ajuda e pelos momentos de descontração no lab.

Muito obrigada a todos!

Seja por amor às causas perdidas

Humberto Gessinger

RESUMO

O reaproveitamento de resíduos agroindustriais tem sido profundamente estudado à medida que se percebe que estes são uma matéria-prima correntemente desperdiçada e sua utilização para a produção de biomoléculas a partir de processos fermentativos é um viés sustentável e que pode e deve ser viabilizado. Enzimas hemicelulolíticas e celulolíticas possuem aplicações diversas em várias indústrias e têm recebido bastante atenção graças ao seu potencial de aplicabilidade na produção de biocombustíveis de segunda geração. Este trabalho teve como objetivo produzir, e recuperar celulasas e hemicelulasas utilizando os cachos vazios dos frutos de palma oleaginosa (EFB), para posterior aplicação na produção de açúcares fermentescíveis para produção de bioetanol. Foi possível selecionar linhagens de fungos filamentosos produtores de complexos enzimáticos compostos de celulasas e hemicelulasas. Foram obtidas atividades expressivas de FPase ($4,0 \pm 0,29$ U/mL), endoglucanase ($23,2 \pm 1,1$ U/mL) e xilanase ($169,1 \pm 0,4$ U/mL), bem como também foi possível detectar atividade de mananases ($0,52 \pm 0,05$ U/mL). Dentre elas, uma linhagem de *Aspergillus* sp. com capacidade de produção de todas as enzimas desejadas se destacou. O meio de produção foi otimizado em termos de fontes de carbono e nitrogênio, e suplementação mineral. A otimização levou a um modelo estatisticamente significativo para o processo fermentativo com R^2 de 0,92. O tempo de produção também foi avaliado, sendo a melhor produtividade obtida em cinco dias de fermentação para FPase, CMCase e xilanase. O processo foi reproduzido eficientemente em reatores de colunas de bolhas em escala de bancada. O meio otimizado aplicado em biorreatores para o *Aspergillus* sp. levou à obtenção de atividades de $9,9 \pm 0,1$ U/mL de FPase, $29,0 \pm 0,1$ U/mL de endoglucanases e $73,3 \pm 0,1$ U/mL de xilanase. Foi avaliada a influência da aeração sobre a produção das enzimas em biorreatores tipo coluna de bolhas e características do caldo fermentado, em que 1,5 vvm mostrou-se a melhor condição para a produção das enzimas. Foi realizada, através de micro e ultrafiltrações, a recuperação das enzimas de interesse, bem como sua concentração. Também foi avaliada a utilização de aditivos químicos para estabilização das enzimas, dentre os quais o ácido benzoico e o sorbitol mostraram-se mais promissores para manutenção da atividade enzimática após 15 dias de exposição a condições de estresse térmico. Em testes de estabilidade a longo prazo, o produto formulado manteve 100% da atividade de FPase, CMCase e mananase e 73% da atividade de xilanase em 60 dias de armazenamento sob refrigeração. O complexo enzimático mostrou-se promissor para aplicação na hidrólise do EFB a açúcares fermentescíveis. Foi possível estabelecer um bioprocessos para a produção e aplicação *on-site* das enzimas lignocelulolíticas.

Palavras-chave: Celulasas. Xilanase. cachos vazios de palma. Biomassa lignocelulósica. Etanol de segunda geração.

ABSTRACT

Reusing agroindustry residues has been profoundly studied as it is perceived that they are useful feedstocks usually wasted. Their use for bioproducts development through fermentative processes is a sustainable bias that can be and must be feasible. Hemicellulolytic and cellulolytic enzymes are applied on several industry fields and they are receiving even more attention due to their potential on second generation biofuels production. This study aimed to produce and recover cellulases and hemicellulases from oil palm empty fruit bunches for further application on lignocellulose conversion to fermentable sugars for biofuel production. It was possible to select fungal strains capable of producing (hemi)cellulolytic complexes. Activity values of 4.0 ± 0.29 U/mL for FPase, 23.2 ± 1.1 U/mL for CMCase, 169.1 ± 0.4 U/mL for xylanase and 0.52 ± 0.05 U/mL for mannanase were detected too. An *Aspergillus* sp. strain produced all the enzymes of the complex and so it was selected for enzyme production. The fermentation media was optimized in terms of carbon and nitrogen sources, as well as mineral supplementation. The optimization led to a statistically significant model, with $R^2 = 0,92$. Production time was studied, reaching best productivities within 5 days fermentation for FPase, CMCase and xylanase. Process was efficiently reproduced to bubble column bioreactors in lab scale. Optimized medium in bioreactors led to activities of 9.9 ± 0.1 U/mL for FPase, 29.0 ± 0.1 U/mL for CMCase and 73.3 ± 0.1 U/mL for xylanase. Aeration influence was also studied over enzyme production in bubble column reactor and fermented broth characteristics, in which it was found that 1.5 vvm provided the best condition for enzyme production. The enzymes were recovered and concentrated through micro and ultrafiltration. The use of chemical additives was also studied, from which it was possible to choose benzoic acid and sorbitol presented better results of enzymatic activity maintaining after 15 days of thermal stress exposure. Concerning to long-term stability, the formulated maintained 100% of FPase, CMCase, and mannanase activities, and 63% of xylanase activity after 60 days of storage under refrigeration. The enzymatic product with additives maintained 100% of FPase, CMCase and mannanase activities and 73% of xylanase activity after 60 days of storage under refrigerated conditions. The enzymatic complex is promising for EFB hydrolysis to fermentable sugars. It was possible to develop a bioprocess for on-site production and application of lignocellulolytic enzymes.

Key-words: Cellulase. Xylanase. EFB – Oil Palm Empty Fruit Bunches. Lignocellulosic biomass. Second generation ethanol.

LISTA DE FIGURAS

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|--|----|
| FIGURA 3-1 – DISTRIBUIÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓLEO DE PALMA NO MUNDO | 29 |
| FIGURA 3-2 – PRODUÇÃO DE ÓLEO DE PALMA NO BRASIL NAS ÚLTIMAS DÉCADAS..... | 30 |
| FIGURA 3-3 – ÁRVORES <i>Elaeis guineensis</i> | 31 |
| FIGURA 3-4 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA ÁRVORE DA PALMA | 32 |
| FIGURA 3-5 – FRUTO DA PALMEIRA <i>Elaeis guineensis</i> DO QUAL SÃO EXTRAÍDOS O ÓLEO DE PALMA E DE PALMISTE | 33 |
| FIGURA 3-6 – CACHOS VAZIOS DE FRUTOS DE PALMA EM DETALHE (A) E ACUMULADO APÓS EXTRAÇÃO (B) | 34 |
| FIGURA 3-7 – EXEMPLOS DE ESTRUTURAS DIVERSAS PARA A HEMICELULOSE | 40 |
| FIGURA 3-8 – ESTRUTURA DA CELULOSE, COM UNIDADES DE CELOBIOSE. | 42 |
| FIGURA 3-9 – ESQUEMA DE PROCESSO DE BIORREFINARIA PARA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO ON-SITE DE ENZIMAS (HEMI)CELULOLÍTICAS | 45 |

4. ATUALIZAÇÃO E REVALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE GHOSE PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE CELULOLÍTICA

| | |
|--|----|
| FIGURA 4-1 – ESQUEMA DOS TESTES REALIZADOS PARA VALIDAÇÃO DA MODIFICAÇÃO NA METODOLOGIA ORIGINAL..... | 62 |
| FIGURA 4-2 – FLUXOGRAMA DESCRITIVO DO PROCEDIMENTO DE ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FPASE PELO MÉTODO DE GHOSE | 64 |
| FIGURA 4-3 – FLUXOGRAMA DESCRITIVO DO PROCEDIMENTO DE ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DE CMCASE PELO MÉTODO DE GHOSE | 65 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 4-4 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA AS TRÊS CONDIÇÕES DE VOLUME REACIONAL TESTADOS NA QUANTIFICAÇÃO DE FPASE | 72 |
| FIGURA 4-5 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA AS TRÊS CONDIÇÕES DE VOLUME REACIONAL TESTADOS NA QUANTIFICAÇÃO DE ENDOGLUCANASES (CMCASE) | 74 |
| 5. PRODUÇÃO on site DE COMPLEXO (HEMI)CELULOLÍTICO UTILIZANDO CACHOS DE FRUTOS VAZIOS DE PALMA COMO SUBSTRATO | |
| FIGURA 5-1 – DIAGRAMAS DE PARETO COM OS EFEITOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS PARA PRODUÇÃO DE FPASE (A), CMCASE (B), XILANASE (C) E MANANASE (D) PRODUZIDAS POR <i>Aspergillus</i> sp. | 107 |
| FIGURA 5-2 – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA CARACTERÍSTICAS DAS INTERAÇÕES ENTRE CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO E PROPORÇÃO DE SUAS FONTES SOBRE A ATIVIDADE DE XILANASE (A); PROPORÇÃO DE PALMA SUSPensa E A CONCENTRAÇÃO TOTAL DE NITROGÊNIO SOBRE A ATIVIDADE DE XILANASE(B); PROPORÇÃO DE PALMA SUSPensa E A PROPORÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO E UREIA (C) TENDO COMO RESPOSTA AS ATIVIDADES DE XILANASE PRODUZIDAS POR <i>Aspergillus</i> sp. | 109 |
| FIGURA 5-3 – DIAGRAMAS DE PARETO COM OS EFEITOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS PARA A PRODUÇÃO DE FPASE (A), CMCASE (B), XILANASE (C) E MANANASE (D) POR <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326 | 113 |
| FIGURA 5-4 – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA CARACTERÍSTICAS DAS INTERAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS INDEPENDENTES SOBRE A ATIVIDADE DE (HEMI)CELULASES PRODUZIDAS POR <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326 | 115 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 5-5 – GRÁFICO DE CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CELULASES POR <i>Aspergillus</i> sp..... | 118 |
| FIGURA 5-6 – GRÁFICO DE CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE HEMICELULASES POR <i>Aspergillus</i> sp. | 119 |
| FIGURA 5-7 – GRÁFICO DE CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CELULASES POR <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326. | 120 |
| FIGURA 5-8 – GRÁFICO DE CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE HEMICELULASES POR <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326..... | 120 |
| FIGURA 5-9 – PERFIL DE PRODUÇÃO DE CELULASES EM BIORREATOR TIPO COLUNA DE BOLHAS COM O PASSAR DO TEMPO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE AERAÇÃO | 125 |
| FIGURA 5-10– PERFIL DE PRODUÇÃO DE HEMICELULASES EM BIORREATOR TIPO COLUNA DE BOLHAS COM O PASSAR DO TEMPO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE AERAÇÃO FERMENTADOS EM REATORES COLUNA DE BOLHAS APÓS 5 DIAS DE FERMENTAÇÃO..... | 126 |
| FIGURA 5-11 – PERFIL DE PRODUÇÃO DE CELULASES EM BIORREATOR TIPO COLUNA DE BOLHAS COM O PASSAR DO TEMPO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE AERAÇÃO..... | 127 |

6. CARACTERIZAÇÃO, SEPARAÇÃO E FORMULAÇÃO DE PRODUTO ENZIMÁTICO (HEMI)CELULOLÍTICO

| | |
|---|-----|
| FIGURA 6-1– ESQUEMA DO PROCEDIMENTO DE CLARIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO POR SISTEMA DE FILTRAÇÃO TANGENCIAL | 139 |
| FIGURA 6-2 – PERFIL DAS TEMPERATURAS DE REAÇÃO DAS (HEMI)CELULASES DE <i>Aspergillus</i> sp..... | 141 |
| FIGURA 6-3 – PERFIL DE pH DE REAÇÃO DAS (HEMI)CELULASES DE <i>Aspergillus</i> sp..... | 143 |
| FIGURA 6-4 – PERFIL CINÉTICO DAS (HEMI)CELULASES DE <i>Aspergillus</i> sp... | 147 |

FIGURA 6-5 – ESTABILIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES SOB EFEITO DE ADITIVOS EM CONDIÇÕES ACELERADAS 154

FIGURA 4-6. –ESTABILIDADE ENZIMÁTICA DAS HEMICELULASES SOB EFEITO DE ADITIVOS EM CONDIÇÕES ACELERADAS 155

7. ESTUDO DE PRÉ-TRATAMENTO E APLICAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO PRODUZIDO NA SACARIFICAÇÃO DE RESÍDUO EFB

FIGURA 7-1 – PROCESSO DE BIORREFINARIA DE PRODUÇÃO *ON-SITE* E APLICAÇÃO DE ENZIMAS (HEMI)CELULOLÍTICAS UTILIZANDO RESÍDUO SÓLIDO EFB PARA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS E O RESÍDUO DA FERMENTAÇÃO COMO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS COM CATÁLISE DAS ENZIMAS PRÓDUZIDAS..... 175

LISTA DE TABELAS

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|---|----|
| TABELA 3-1 – COMPOSIÇÃO LIGNOCELULÓSICA DOS CACHOS VAZIOS DOS FRUTOS DA PALMA EM DIFERENTES REGIÕES DO MUNDO | 36 |
| TABELA 3-2 – ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS (HEMI) CELULOLÍTICAS UTILIZANDO FUNGOS FILAMENTOSOS | 51 |

4. ATUALIZAÇÃO E REVALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE GHOSE PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE CELULOLÍTICA

| | |
|--|----|
| TABELA 4-1 – VOLUMES REACIONAIS APLICADOS NA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE ATIVIDADES DE FPASE (FPASE) | 64 |
| TABELA 4-2 – VOLUMES REACIONAIS APLICADOS NA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE ATIVIDADES DE ENDOGLUCANASES (CMCASE) | 66 |
| TABELA 4-3 – CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCAR OBTIDAS NO PRIMEIRO DIA, NOS TRÊS BANHOS, PARA OS TRÊS VOLUMES | 70 |
| TABELA 4-4 – ATIVIDADES NOS DIAS 2 E 3, REALIZADAS NUM MESMO EQUIPAMENTO..... | 70 |
| TABELA 4-5 –CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCAR OBTIDAS NO PRIMEIRO DIA, NOS TRÊS BANHOS, PARA OS TRÊS VOLUMES | 71 |
| TABELA 4-6. ATIVIDADES NOS DIAS 2 E 3, REALIZADAS NUM MESMO EQUIPAMENTO..... | 71 |

5. PRODUÇÃO on site DE COMPLEXO (HEMI)CELULOLÍTICO UTILIZANDO EFB COMO SUBSTRATO

| | |
|--|--|
| TABELA 5-1 – LINHAGENS DE FUNGOS FILAMENTOSOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS (HEMI)CELULOLÍTICAS UTILIZANDO | |
|--|--|

| | |
|---|-----|
| OS CACHOS VAZIOS DOS FRUTOS DE PALMA COMO SUBSTRATO | 84 |
| TABELA 5-2 – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS UTILIZADOS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DAS CELULASES | 85 |
| TABELA 5-3 – NÍVEIS DAS VARIÁVEIS AVALIADAS NO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN | 89 |
| TABELA 5-4 – NÍVEIS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR PARA ESTUDO DOS FATORES PROPORÇÃO DE PALMA, CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO E PROPORÇÃO UREIA E SULFATO DE AMÔNIO SOBRE A PRODUÇÃO DAS (HEMI)CELULASES POR <i>Aspergillus</i> sp. E <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326 | 90 |
| TABELA 5-5 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO RESÍDUO DE EFB UTILIZADO NO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS (HEMI)CELULOLÍTICAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS | 91 |
| TABELA 5-6 – ÍONS DETECTADOS NO EXTRATO DOS CACHOS VAZIOS DOS FRUTOS DA PALMA APÓS O TRATAMENTO TÉRMICO | 92 |
| TABELA 5-7 – ATIVIDADES (HEMI)CELULOLÍTICAS DAS ENZIMAS PRODUZIDAS POR DIFERENTES LINHAGENS DE FUNGOS FILAMENTOSOS | 94 |
| TABELA 5-8 – COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE ENZIMAS DOS MICRO- ORGANISMOS TESTADOS E PRODUÇÃO DE GLICOSE A PARTIR DE SEUS EXTRATOS | 97 |
| TABELA 5-9 – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS NOS ENSAIOS COM CONDIÇÕES DEFINIDAS PELO PLANEJAMENTO PLACKETT- BURMAN PARA <i>Aspergillus</i> sp. | 98 |
| TABELA 5-10 – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS NOS ENSAIOS COM CONDIÇÕES DEFINIDAS PELO PLANEJAMENTO PLACKETT- BURMAN PARA <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326. | 99 |
| TABELA 5-11 – EFEITOS DAS VARIÁVEIS SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS PARA AS DUAS CEPAS | 100 |

| | |
|---|-----|
| TABELA 5-12 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS (HEMI)CELULASES PRODUZIDAS POR <i>Aspergillus</i> sp. SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE FONTES DE NITROGÊNIO..... | 103 |
| TABELA 5-13 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS (HEMI)CELULASES PRODUZIDAS POR <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326 SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE FONTES DE NITROGÊNIO..... | 103 |
| TABELA 5-14 – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS NOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DCCR PARA <i>Aspergillus</i> sp..... | 105 |
| TABELA 5-15 – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS NOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DDCR 2 ³ PARA <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326..... | 112 |
| TABELA 5-16 – CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA A PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO E ATIVIDADES OBTIDAS..... | 117 |
| TABELA 5-17 – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS NA FERMENTAÇÃO EM FRASCOS DE ERLNMEYER E REATOR TIPO COLUNA DE BOLHAS COM A CEPA <i>Aspergillus</i> sp..... | 123 |

6. SEPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E FORMULAÇÃO DE PRODUTO ENZIMÁTICO CELULOLÍTICO

| | |
|--|-----|
| TABELA 6-1 – TAMPÕES EMPREGADOS NOS TESTES DE DETERMINAÇÃO DE pH ÓTIMO DAS ENZIMAS..... | 133 |
| TABELA 6-2 – CONCENTRAÇÕES DOS SUBSTRATOS UTILIZADOS NOS QUATRO ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS..... | 134 |
| TABELA 6-3 – ATIVIDADES RELATIVAS DAS (HEMI)CELULASES DE <i>Aspergillus</i> sp. QUANDO SOB INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE ÍONS, AÇÚCARES E SAL QUELANTE | 145 |
| TABELA 6-4 – PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS CALCULADOS PARA AS (HEMI)CELULASES DE <i>Aspergillus</i> sp..... | 146 |

| | |
|---|-----|
| TABELA 6-5 – TEMPOS DE MEIA VIDA DAS (HEMI)CELULASES ENTRE 50 E 80°C..... | 149 |
| TABELA 6-6 – ATIVIDADE ESPECÍFICA DAS FRAÇÕES RETIDAS E FILTRADAS EM CADA UMA DAS MEMBRANAS | 152 |
| TABELA 6-7 – EFICIÊNCIA DE CONCENTRAÇÃO REALIZADA UTILIZANDO MEMBRANA DE 30 KDa..... | 153 |
| TABELA 6-8 – ATIVIDADES RESIDUAIS RESULTANTES DA COMBINAÇÃO DO SORBITOL E ÁCIDO BENZOICO E SUAS CONCENTRAÇÕES EM UM PLANEJAMENTO FATORIAL DO TIPO DCCR..... | 158 |

7. ESTUDO DE PRÉ-TRATAMENTO E APLICAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO PRODUZIDO NA SACARIFICAÇÃO DE EFB

| | |
|--|-----|
| TABELA 7-1 – NÍVEIS E FATORES DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ PARA ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO DO RESÍDUO DOS CACHOS VAZIOS DA PALMA | 166 |
| TABELA 7-2 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO RESÍDUO DOS CACHOS VAZIOS DOS FRUTOS DE PALMA..... | 167 |
| TABELA 7-3 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE RESÍDUOS DE CACHOS VAZIOS DE FRUTOS DE PALMA EM DIFERENTES ESTUDOS..... | 168 |
| TABELA 7-4 – RENDIMENTOS DAS HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS DOS RESÍDUOS DE CACHOS VAZIOS DE PALMA PRÉ-TRATADOS | 169 |
| TABELA 7-5 – RENDIMENTOS E AÇÚCARES OBTIDOS NA HIDRÓLISE DO RESÍDUO DE EFB PRÉ-TRATADO NAS CONDIÇÕES ESPECIFICADAS PELO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ | 172 |
| TABELA 7-6 – AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS LIBERADOS NA HIDRÓLISE DE EFB PRÉ-TRATADO E DO RESÍDUO SÓLIDO DA FERMENTAÇÃO PRÉ-TRATADO | 174 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2G – Segunda geração

AB – Ácido benzoico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CBD – *Cellulose biding domain*

CMCase – Atividade de endoglucanase

DNS – Reativo à base de ácido 3,5-dinitrossalicílico

EC – *Enzyme comission*

EG – Endoglucanase

EFB – *Empty Fruit Bunches* (cachos vazios dos frutos da palma)

FPase – Atividade de FPase

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

PDA – *Potato Dextrose Agar* (meio de cultivo)

POME – *Palm Oil Mill Effluent* (Efluente do processamento de óleo de palma)

DNS – Reativo cromóforo à base de ácido -3,5- dinitrosalicílico

XBD – *xilan binding domain*

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO | 25 |
| 2. | OBJETIVOS | 27 |
| 2.1. | OBJETIVO GERAL | 27 |
| 2.2. | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 27 |
| 3. | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 28 |
| 3.1. | PALMA OLEAGINOSA | 28 |
| 3.1.1. | “Golden crop” - A cultivar de ouro | 30 |
| 3.1.2. | Processamento do óleo de palma | 32 |
| 3.1.3. | Cachos vazios dos frutos da palma..... | 34 |
| 3.2. | ESTRUTURAS LIGNOCELULÓSICAS | 36 |
| 3.2.1. | Lignina | 37 |
| 3.2.2. | Hemiceluloses..... | 39 |
| 3.2.3. | Celulose | 41 |
| 3.3. | BIORREFINARIAS..... | 44 |
| 3.4. | CELULASES | 45 |
| 3.4.1. | Endoglucanases | 47 |
| 3.4.2. | Exoglucanases (celobiohidrolases) | 47 |
| 3.4.3. | β -glucosidases | 48 |
| 3.5. | HEMICELULASES | 48 |
| 3.5.1. | Xilanases | 48 |
| 3.5.2. | Mananases | 49 |
| 3.4. | PRODUÇÃO DE ENZIMAS (HEMI)CELULOLÍTICAS | 50 |
| 3.4.1. | Micro-organismos produtores..... | 50 |
| 3.5. | PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS (HEMI)CELULOLÍTICAS | 52 |
| 3.5.1. | Separação celular | 52 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.5.2. | Filtração tangencial | 53 |
| 3.5.2.1. | Microfiltração e ultrafiltração | 54 |
| 3.6. | FORMULAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS | 54 |
| 3.7. | HIDRÓLISE ENZIMÁTICA | 56 |
| 3.8. | APLICAÇÃO DE ENZIMAS (HEMI)CELULOLÍTICAS NA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS | 57 |
| 3.8.1. | Utilização de matéria-prima residual..... | 58 |
| 3.9. | CONCLUSÃO | 59 |
| 4. | ATUALIZAÇÃO E REVALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE GHOSE PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE CELULOLÍTICA | 60 |
| 4.1. | INTRODUÇÃO | 60 |
| 4.2. | MATERIAL E MÉTODOS..... | 62 |
| 4.2.1. | Material | 63 |
| 4.2.2. | Teste do branco do substrato para o ensaio de FPase | 63 |
| 4.2.3. | Atividade de FPase (FPase) | 63 |
| 4.2.4. | Atividade de Endoglucanases (CMCase) | 65 |
| 4.2.5. | Padronizações | 66 |
| 4.2.6. | Procedimentos de validação | 66 |
| 4.2.6.1. | <i>Linearidade</i> | 67 |
| 4.2.6.2. | <i>Precisão e exatidão</i> | 68 |
| 4.2.6.3. | <i>Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)</i> | 68 |
| 4.3. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 69 |
| 4.3.1. | Teste do branco do substrato para o ensaio de FPase | 69 |
| 4.3.2. | Experimentos de hidrólise enzimática para revalidação do método .. | 69 |
| 4.3.3. | Linearidade | 71 |
| 4.3.3.1. | <i>FPase</i> | 72 |
| 4.3.3.2. | <i>CMCase</i> | 73 |
| 4.3.4. | Precisão e exatidão..... | 75 |
| 4.3.4.1. | <i>FPase</i> | 75 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.3.4.2. | <i>Endoglucanase</i> | 76 |
| 4.3.5. | Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)..... | 77 |
| 4.3.5.1. | <i>FPase</i> | 77 |
| 4.3.6. | <i>Endoglucanase</i> | 77 |
| 4.3.6. | Discussão | 78 |
| 4.4. | CONCLUSÃO | 79 |
| 5. | PRODUÇÃO <i>on site</i> DE COMPLEXO (HEMI)CELULOLÍTICO UTILIZANDO CACHOS DE FRUTOS VAZIOS DE PALMA COMO SUBSTRATO | 80 |
| 5.1. | INTRODUÇÃO..... | 80 |
| 5.2. | MATERIAL E MÉTODOS..... | 82 |
| 5.2.1. | Caracterização do resíduo | 82 |
| 5.2.2. | Seleção de linhagens produtoras de enzimas (hemi)celulolíticas | 83 |
| 5.2.3. | Micro-organismos..... | 83 |
| 5.2.4. | Produção de enzimas por fermentação submersa com sólidos suspensos..... | 84 |
| 5.2.5. | Atividade de <i>FPase</i> (<i>FPase</i>) | 86 |
| 5.2.6. | Atividade de endoglucanase (<i>CMCase</i>) | 86 |
| 5.2.7. | Atividade de xilanase | 86 |
| 5.2.8. | Atividade de mananase..... | 87 |
| 5.2.9. | Hidrólise enzimática do resíduo pré-tratado | 87 |
| 5.2.10. | Teste de viabilidade celular do micro-organismo..... | 88 |
| 5.2.11. | Seleção dos componentes minerais do meio de produção de enzimas (hemi)celulolíticas | 88 |
| 5.2.12. | Avaliação da influência das fontes de nitrogênio sobre a produção de enzimas | 89 |
| 5.2.13. | Otimização do meio para a produção de enzimas (hemi)celulolíticas | 89 |
| 5.2.14. | Validação do modelo matemático | 90 |
| 5.2.15. | Cinética de produção de (hemi)celulases..... | 90 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 5.2.16. | Produção das enzimas em biorreatores tipo coluna de bolhas..... | 91 |
| 5.3. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 91 |
| 5.3.1. | Caracterização do resíduo | 91 |
| 5.3.2. | Seleção de linhagens produtoras de enzimas (hemi)celulolíticas | 93 |
| 5.3.3. | Suplementação mineral..... | 98 |
| 5.3.4. | Avaliação da influência das fontes de nitrogênio sobre a produção de enzimas | 102 |
| 5.3.5. | Otimização do meio de cultivo para produção de enzimas (hemi)celulolíticas utilizando <i>Aspergillus</i> sp..... | 104 |
| 5.3.6. | Otimização do meio de cultivo para produção de enzimas (hemi)celulolíticas utilizando <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326 | 111 |
| 5.3.7. | Estudo cinético de produção de complexo (hemi)celulolítico por <i>Aspergillus</i> sp..... | 118 |
| 5.3.8. | Estudo cinético de produção de complexo (hemi)celulolítico por <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326 | 120 |
| 5.3.9. | Viabilidade celular do <i>Aspergillus</i> sp. | 122 |
| 5.3.10. | Produção em biorreatores utilizando a cepa selecionada <i>Aspergillus</i> sp..... | 123 |
| 5.3.11. | Estudo da Influência da aeração sobre a produção de enzimas em biorreator tipo coluna de bolhas por <i>Aspergillus</i> sp. | 124 |
| 5.4. | CONCLUSÃO | 128 |
| 6. | CARACTERIZAÇÃO, SEPARAÇÃO, PURIFICAÇÃO E FORMULAÇÃO DE PRODUTO ENZIMÁTICO (HEMI)CELULOLÍTICO | 129 |
| 6.1. | INTRODUÇÃO..... | 129 |
| 6.2. | MATERIAL E MÉTODOS..... | 130 |
| 6.2.1. | Atividade de FPase (FPase) | 130 |
| 6.2.2. | Atividade de endoglucanase (CMCase) | 131 |
| 6.2.3. | Atividade de xilanase | 131 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 6.2.4. | Atividade de mananase..... | 132 |
| 6.2.5. | Determinação da concentração de proteínas | 132 |
| 6.2.6. | Caracterização bioquímica das enzimas | 132 |
| 6.2.6.1. | <i>Determinação do perfil de temperatura de aplicação das enzimas..</i> | 132 |
| 6.2.6.2. | <i>Determinação do perfil de pH de atuação das enzimas.....</i> | 133 |
| 6.2.6.3. | <i>Influência de íons e açúcares sobre a atividade enzimática</i> | 133 |
| 6.2.6.4. | <i>Determinação de parâmetros cinéticos</i> | 134 |
| 6.2.6.5. | <i>Energia de Ativação</i> | 135 |
| 6.2.6.6. | <i>Estabilidade à temperatura.....</i> | 135 |
| 6.2.6.7. | <i>Constante e energia de inativação térmica.....</i> | 136 |
| 6.2.6.8. | <i>Tempo de meia vida</i> | 136 |
| 6.2.6.9. | <i>Parâmetros termodinâmicos de inativação</i> | 137 |
| 6.2.7. | Separação e clarificação do extrato enzimático | 137 |
| 6.2.7.1. | <i>Definição de estratégia de separação e concentração de enzimas .</i> | 138 |
| 6.2.7.2. | <i>Filtração e concentração em membranas de fluxo tangencial</i> | 138 |
| 6.2.8. | Formulação do produto enzimático | 139 |
| 6.3. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 140 |
| 6.3.1. | Caracterização das enzimas | 140 |
| 6.3.1.1. | <i>Determinação do perfil de temperatura</i> | 140 |
| 6.3.1.2. | <i>Determinação do perfil de pH.....</i> | 142 |
| 6.3.1.3. | <i>Influência de íons e açúcares sobre a atividade enzimática</i> | 144 |
| 6.3.2. | Caracterização cinética e termodinâmica..... | 146 |
| 6.3.2.1. | <i>Cinética enzimática</i> | 147 |
| 6.3.2.2. | <i>Energia de ativação.....</i> | 148 |
| 6.3.2.3. | <i>Estabilidade à temperatura.....</i> | 148 |
| 6.3.2.4. | <i>Constante e energia de inativação térmica.....</i> | 149 |
| 6.3.2.5. | <i>Tempo de meia vida.....</i> | 149 |
| 6.3.2.6. | <i>Parâmetros termodinâmicos de inativação</i> | 150 |
| 6.3.3. | Separação e purificação das enzimas produzidas | 151 |
| 6.3.3.1. | <i>Definição de estratégia de separação e concentração das (hemi)celulases de Aspergillus sp.</i> | 151 |
| 6.3.3.2. | <i>Concentração da enzima em membranas de fluxo tangencial.....</i> | 153 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 6.3.4. | Formulação do produto enzimático | 154 |
| 6.3.4.1. | <i>Determinação das concentrações dos aditivos</i> | 157 |
| 6.3.4.2. | <i>Análise de estabilidade do produto formulado</i> | 159 |
| 6.4. | CONCLUSÃO | 160 |
| 7. | ESTUDO DE PRÉ-TRATAMENTO E APLICAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO PRODUZIDO NA SACARIFICAÇÃO DE RESÍDUO EFB | 162 |
| 7.1. | INTRODUÇÃO..... | 162 |
| 7.2. | MATERIAL E MÉTODOS..... | 164 |
| 7.2.1. | Preparo e caracterização centesimal do material lignocelulósico | 164 |
| 7.2.2. | Seleção do pré-tratamento..... | 165 |
| 7.2.3. | Hidrólise enzimática com celulase comercial | 165 |
| 7.2.4. | Determinação de condições do pré-tratamento..... | 165 |
| 7.2.5. | Determinação de açúcares | 166 |
| 7.2.6. | Produção de açúcares fermentescíveis a partir de resíduos de EFB utilizando o complexo enzimático produzido por <i>Aspergillus</i> sp. | 166 |
| 7.3. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 167 |
| 7.3.1. | Caracterização centesimal do resíduo dos cachos vazios dos frutos de palma..... | 167 |
| 7.3.2. | Seleção dos pré-tratamentos termoquímicos para exposição da celulose do resíduo de cachos vazios dos frutos de palma | 168 |
| 7.3.3. | Determinação das melhores condições do tratamento alcalino | 171 |
| 7.3.4. | Produção de açúcares fermentescíveis a partir e resíduos de EFB utilizando o complexo enzimático produzido por <i>Aspergillus</i> sp. | 173 |
| 7.4. | CONCLUSÃO | 175 |
| | CONCLUSÕES GERAIS | 177 |
| | PERSPECTIVAS FUTURAS | 178 |
| | REFERÊNCIAS | 179 |

1. INTRODUÇÃO

A produção e aplicação de enzimas (hemi)celulolíticas ditas *on site*, ou seja, aquelas que são produzidas e aplicadas dentro de um mesmo processo, tem sido explorada em estudos científicos mais recentemente (INOUE et al, 2016; ZHAO et al, 2018), considerando o aumento no interesse sobre o uso dessas enzimas na produção de combustíveis renováveis, em detrimento do uso de combustíveis fósseis.

O Brasil é um país de base agroindustrial, que, por consequência possui uma produção de material residual advindo dessas indústrias. Parte desses resíduos tem composição lignocelulósica, ou seja, possui uma estrutura composta de celulose, hemicelulose e lignina, componentes estruturais da parede celular dos vegetais, que conservam uma grande quantidade de energia em suas estruturas, empregada atualmente, em sua maioria, na produção de energias térmica e elétrica.

Resíduos como bagaço de cana, farelo de soja, cascas de cacau e de processamento de palma oleaginosa são abundantes no país. Este último apresenta variadas configurações residuais, sendo a mais proeminente os cachos vazios dos frutos prensados no processo produtivo, cujo montante gerado é de 1,1 tonelada para cada tonelada de óleo produzido (ADITIYA et al. 2015).

Uma das dádivas da biotecnologia é a sua capacidade de agregar valor a materiais muitas vezes considerados resíduos. A proposta de adicionar valor vem ao encontro da necessidade de encontrar destinos mais sustentáveis para os resíduos de indústria.

A união da necessidade de reaproveitamento com o interesse na produção e aplicação *on site* de enzimas, leva aos processos de produção dessas proteínas utilizando esse tipo de resíduo como matéria-prima (DELABONA et al., 2012; LI et al., 2017). A proposta é que as enzimas produzidas nessas condições substituam total ou parcialmente as enzimas comerciais dentro da cadeia de aproveitamento desses resíduos, uma vez que os produtos enzimáticos comerciais são caros e podem inviabilizar a produção a partir destes. A substituição pelas enzimas *on site* permite que seja utilizado um insumo mais barato na produção dos açúcares fermentescíveis para produção de combustíveis ou de outras biomoléculas.

Dentro do contexto de reaproveitamento de resíduos agroindustriais brasileiros, a empresa VALE S.A., responsável por grande parte da produção de óleo de palma no país, em sua divisão Biopalma da Amazônia S.A., desenvolveu projetos, em parceria com o Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR, de reutilização de biomassa residual do processamento de palma oleaginosa para produção de biomoléculas de interesse comercial. Este trabalho faz parte dos subprojetos de produção e aplicação de enzimas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração.

Dadas as informações a respeito da produção e aplicação *on site* de enzimas, este trabalho teve como objetivo produzir, recuperar, concentrar, formular e aplicar um complexo enzimático (hemi)celulolítico utilizando material residual da indústria da palma oleaginosa através de processos fermentativos catalisados por fungos filamentosos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Produzir e aplicar enzimas (hemi)celulolíticas no contexto da produção *on site*, para obtenção de açúcares fermentescíveis, utilizando cachos vazios de frutos de palma oleaginosa (EFB).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar micro-organismos para produção das enzimas.
- Realizar estudos de otimização do meio de cultivo em fermentação em estado semissólido para produção das enzimas.
- Produzir as enzimas em biorreatores do tipo de coluna de bolhas em escala de bancada.
- Estudar a cinética de produção das enzimas nas condições otimizadas.
- Caracterizar, recuperar e concentrar as enzimas produzidas.
- Realizar estudos de formulação de um produto enzimático, bem como avaliar sua estabilidade e determinar as melhores condições de armazenamento.
- Aplicar o produto formulado na hidrólise de resíduo de EFB para produzir açúcares fermentescíveis.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A discussão em torno das biorrefinarias tem tido destaque crescente nas últimas décadas. A bioeconomia tem se desenvolvido cada vez mais e os resíduos agroindustriais têm sido vistos mais como matéria prima e menos como lixo, assim como outros tipos de materiais frequentemente descartados, como colocado pela ambientalista Fernanda Cortez, no terceiro fórum de economia limpa, da Folha de São Paulo, em 27 de agosto de 2018 (FOLHA, 2018).

A utilização desses resíduos pode baratear a produção de biomoléculas e reduzir a quantidade de material depositado na natureza ou queimado para produção de energia e, conseqüentemente, de poluentes. É preciso entender como funcionam os mecanismos de ação para a produção dessas biomoléculas; como atuam micro-organismos responsáveis por suas biotransformações, onde podem ser encaixadas cada uma das peças no quebra-cabeças de um bioprocessamento para que possamos, com a ajuda e permissão da natureza, moldá-la, dando ao mundo a possibilidade de ser produtivo e sustentável.

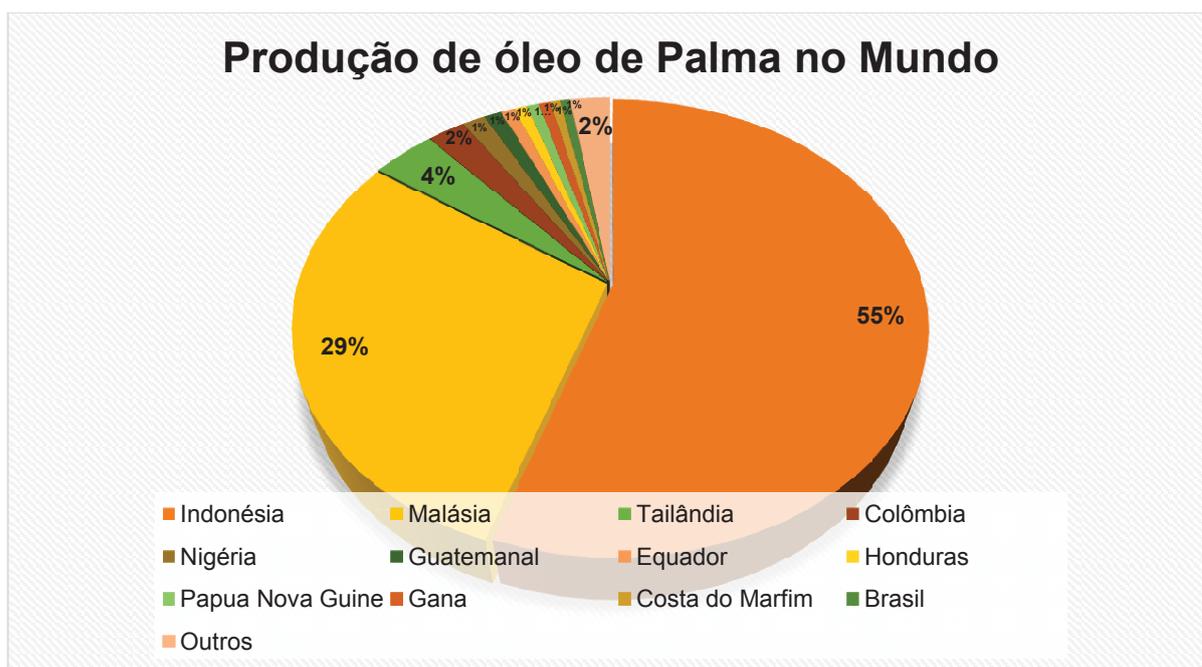
3.1. PALMA OLEAGINOSA

A indústria dos óleos comestíveis tem como produto predominante, em termos de produção, o óleo de palma, que é destinado, sobretudo, à indústria de alimentos, cosméticos e energia. Em alimentos, é utilizado em margarinas, óleos e uma grande variedade de produtos processados. Ainda é aplicado em produção de detergentes e sabonetes. Mas é na indústria de biodiesel que o óleo de palma vem ganhando destaque nos últimos anos. Segundo dados publicados pela revista *New Scientist* (2018), nos próximos anos, a tendência é de que a principal aplicação do óleo de palma seja a produção de biodiesel, enquanto a produção de alimentos, principal destino atual, não deve aumentar na mesma proporção (LE PAGE, 2018). Dentre os óleos vegetais, o óleo de palma é o mais utilizado na produção de biodiesel (OIL WORLD *apud* UFOP, 2017).

A utilização do óleo de palma em detrimento dos demais óleos vegetais se deve à sua grande produtividade, em termos de milhões de toneladas por hectare plantado, o que rendeu à palmeira a alcunha de cultivar de ouro (do inglês *Golden crop*), sendo dez vezes mais produtiva que a soja (PALM OIL WORLD, 2018). Ainda pode ser adicionado à conta da produtividade da palma a produção do óleo de palmiste, que também pode ser utilizado em alimentos, cosméticos e produtos de higiene pessoal; e da torta de palmiste, frequentemente utilizada para ração animal (BIOPALMA, 2018a).

Mundialmente, no biênio 2017/2018 o óleo de palma foi o mais produzido, com 67 milhões de toneladas, seguido de soja, com 56 milhões de toneladas, colza com 29 milhões de toneladas e girassol com 18 milhões de toneladas (USDA *apud* UFOP, 2017). Países do Sul da Ásia, tais como a Malásia e a Indonésia, tem se destacado na produção do óleo de palma, dominando cerca de 85% da produção mundial (SIMEDARBY, 2013). Dados do Index Mundi colocam a Indonésia como a maior produtora em 2017, seguida de Malásia e Tailândia (FIGURA 3-1) (INDEX MUNDI, 2018a). De acordo com a fundação WWF (2012), a previsão é de que a produção do óleo aumente, mundialmente, mais de 65% até 2020.

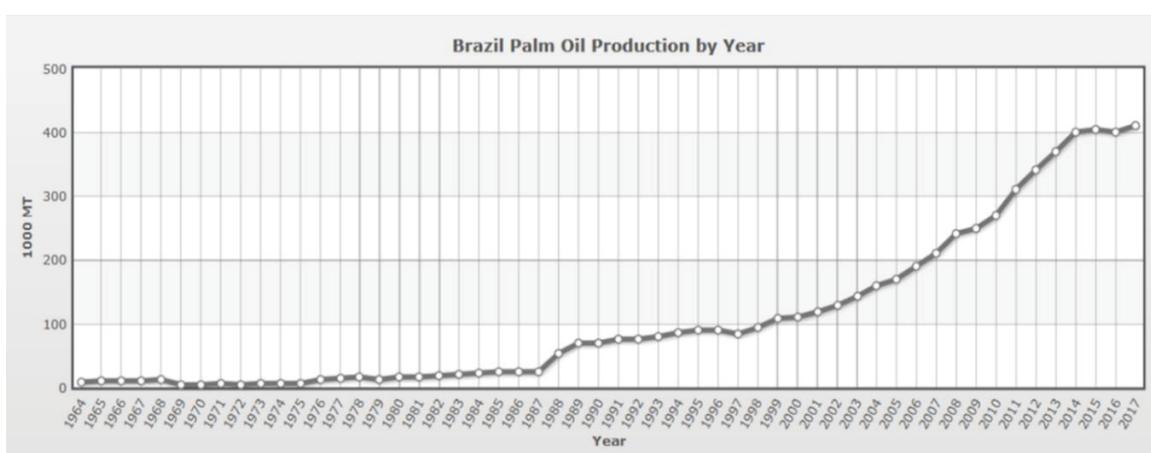
FIGURA 3-1 - DISTRIBUIÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓLEO DE PALMA NO MUNDO



FONTE: A autora, com dados de INDEX MUNDI (2018).

No Brasil, em 2017, a produção de óleo de palma foi 1,31% do total mundial com 410.000 toneladas sendo produzidas naquele ano (INDEX MUNDI, 2018b). É notável que houve um crescimento considerável no total de produção nos últimos 20 anos; esta, entretanto, tem se mantido estável nos últimos 4 anos, sem grandes aumentos de produção, como mostra o gráfico do Index Mundi, elaborado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (FIGURA 3-2).

FIGURA 3-3 - PRODUÇÃO DE ÓLEO DE PALMA NO BRASIL DE 1964 A 2014



FONTE: INDEX MUNDI (2018b).

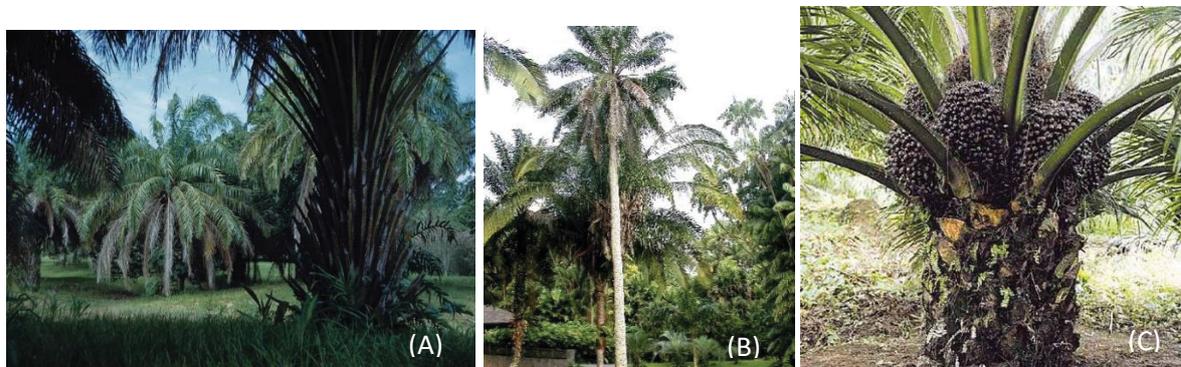
Boa parte da produção de óleo de palma no Brasil é feita pela Biopalma da Amazônia S.A., empresa do grupo VALE S.A., que está presente na região Norte do país nas cidades de Acará, Moju, Tomé-Açu e Concórdia do Pará, trabalhando em associação com o Programa Nacional de Agricultura Familiar, do Governo Federal. Sua produção inclui o óleo de palma, o óleo de palmiste e a torta de Kernel (BIOPALMA, 2018b).

3.1.1. “Golden crop” - A cultivar de ouro

A produção do óleo de palma se dá a partir de algumas variedades de palmáceas do gênero *Elaeis*, sobretudo as da espécie *Elaeis guineensis*. Tais árvores (FIGURA 3-3), também conhecidas como dendezeiros, pertencem à família

das *Arecaceae*, crescem até vinte metros de altura e suas folhas podem atingir de três a cinco metros de comprimento. Os frutos atingem a maturação de cinco a seis meses após a polinização, apresentando-se, posteriormente, na forma de fruto oleaginoso com uma semente também oleaginosa (SUMATHI; CHAI; MOHAMED, 2008). A FIGURA 3-4 mostra a classificação taxonômica resumida da *Elaeis guineensis*, desde seu reino até a espécie, passando por filo, classe, subclasse, ordem, família, gênero e espécie.

FIGURA 3-2 - ÁRVORES *Elaeis guineensis*



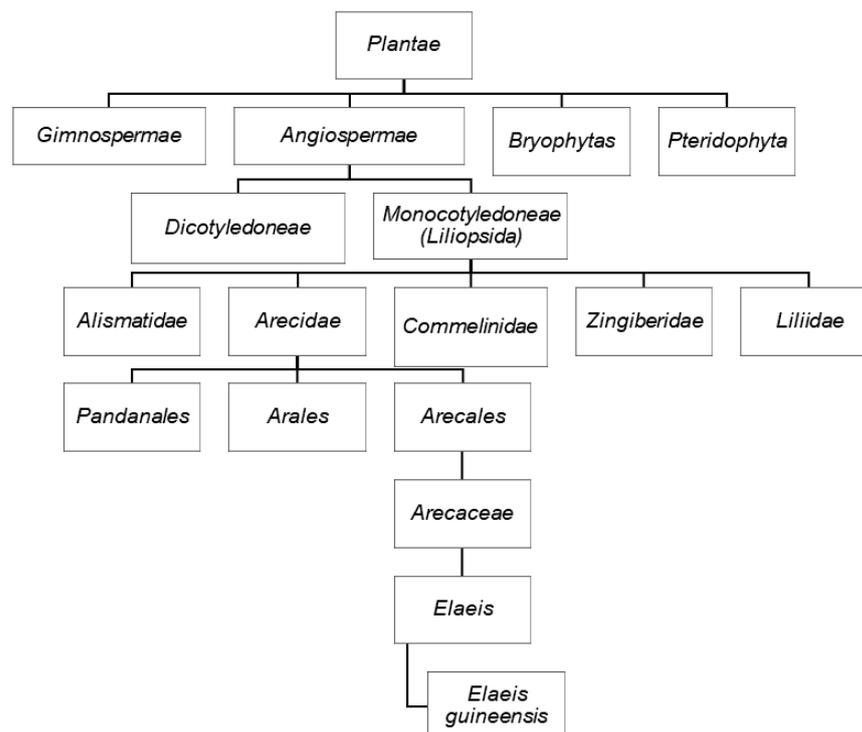
FONTE: PALMPEDIA. (2016)

LEGENDA: (A) Plantação em Cuba; foto por L. H. BAILEY HORTORIUM (2012).

(B) Cingapura; foto do acervo da PALMPEDIA (2007).

(C) Costa Rica, Foto de ECOPORT (2013).

FIGURA 3-3 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA ÁRVORE DA PALMA



FONTE: A autora (2017). Com informações de NCBI (2002); SIMPSON, M. G. (2010); NCBI (2017); ORWA et al. (2009).

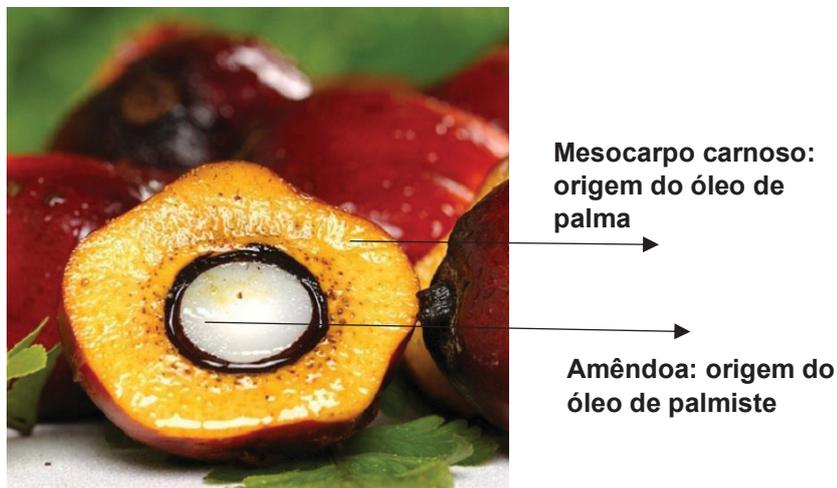
O gênero *Elaeis* possui apenas duas espécies e pertence à família *Arecaceae*, também denominada *palmae*, que contempla as palmáceas. A família *Arecaceae* é a única de sua ordem, das *Arecales*.

3.1.2. Processamento do óleo de palma

O processo de extração começa com a esterilização ou cozimento dos frutos frescos, que pode ser feito por vapor ou por água quente, a cerca de 130°C, sob pressão de 2,5 a 3 atm. Esse tratamento é feito para inativar enzimas que possam degradar o óleo e para reações de hidrólise e autoxidação. Em seguida, os frutos são debulhados, separando os frutos dos cachos. Os cachos são o primeiro resíduo do processamento propriamente dito do óleo. Em seguida os frutos seguem para a prensagem, podendo antes passar por uma digestão a quente para auxílio na

ruptura das células. A prensagem é feita em prensa contínua, na qual o óleo do mesocarpo carnoso (FIGURA 3-5) é removido. Após essa etapa, o óleo passa por processos de clarificação e purificação, onde são removidas partículas pesadas, sujeiras e impurezas, geralmente essas etapas são feitas em centrífugas e decantadores. A mistura que vai para clarificação contém resíduo de óleo, água e borra se torna material residual, denominado POME, do inglês *palm oil mill effluent* (efluente de processamento de óleo de palma). Realizando uma secagem do material, a borra pode ser destinada à alimentação animal. As fibras são o segundo resíduo do processo, geralmente destinadas à queima. Já as amêndoas são separadas para produção do óleo de palmiste, através de uma quebra e posterior prensagem das amêndoas. O resíduo sólido dessa segunda prensagem resulta na torta de Kernel, que é utilizada para alimentação animal (MORAIS et al., 2013; BIODIESELBR, 2018; FAO, 2018).

FIGURA 3-4–FRUTO DA PALMEIRA *Elaeis guineensis* DO QUAL SÃO EXTRAÍDOS O ÓLEO DE PALMA E DE PALMISTE



FONTE: GREEN PALM SUSTAINABILITY (2018)

A extração do óleo de palma a partir dos frutos da *Elaeis guineensis* gera biomassa residual de diversas partes da planta: folhas, caule e os cachos vazios dos quais foram retirados os frutos, usualmente denominados “EFB” (do inglês *empty fruit bunches*). Estes últimos correspondem a 20% da massa total do fruto fresco, sendo a fração de resíduo produzida em maior quantidade no processo (4,42

toneladas/hectare.ano) (CHANG, 2014), com uma produção de 1,1 tonelada de EFB para cada tonelada de óleo produzido. Somente na Malásia, o resíduo total da indústria da palma é responsável por 85% dos resíduos agroindustriais do país (ADITIYA et al., 2016). Diversos destinos de reaproveitamento têm sido estudados para esses resíduos, sobretudo o EFB, tais como a produção de gás metano, bioplásticos, ácidos orgânicos, produção de carvão e produção de etanol de segunda geração (CUI et al., 2014).

3.1.3. Cachos vazios dos frutos da palma

Os cachos vazios oriundos da debulhagem dos frutos da palma oleaginosa (FIGURA 3-6), normalmente, são destinados à queima para geração de energia e/ou para fertilização dos campos de palma. Essa prática, porém, tem sido desencorajada devido à grande quantidade de fumaça poluente que produz (YUSOFF, 2006; ABRAPALMA, 2018). Dessa forma, diversos estudos têm sido desenvolvidos com objetivo de encontrar uma forma de reutilizar esse resíduo para produção de diferentes bioprodutos e energia de forma sustentável.

FIGURA 3-5– CACHOS VAZIOS DE FRUTOS DE PALMA EM DETALHE (A) E ACUMULADO APÓS EXTRAÇÃO (B)



FONTE: (A) FELDA PALM INDUSTRIES (2016); (B) BIOENERGY CONSULTS ([20--]).

O principal produto pesquisado são os açúcares fermentescíveis que podem ser obtidos a partir do material lignocelulósico que compõe a fibra. Tais açúcares são, principalmente, a glicose (SITI AISYAH; UEMURA, YUSUP, 2014; ZAKARIA; HIRATA; HASSAN, 2015), que pode ser obtida a partir da hidrólise da celulose, e a xilose (ZHANG et al., 2012), obtida a partir da hidrólise da hemicelulose, ou ambas em um mesmo processo (SHAMSUDIN et al., 2012; YING et al., 2014; ZANIRUN et al., 2015). A produção desses açúcares visa a produção de etanol de segunda geração, (SUDIYANI et al., 2013; TAN et al., 2013; CARDONA et al., 2018), além de outras biomoléculas de interesse.

Além desses produtos de destaque, procura-se ainda utilizar a lignina presente no material e produzir outros bioprodutos, tais como ácidos orgânicos (BARI et al., 2009; CHIN et al., 2015), hidrogênio (SIVASANGAR et al., 2015), enzimas (ALAM et al., 2009; KIM; KIM, 2012) e nanofibras de celulose (FAHMA et al., 2010; JONOOBI et al., 2011).

Os cachos vazios dos frutos da palma tem uma composição lignocelulósica já reportada por diversos autores, como pode ser observado na TABELA 3-1. A maioria dos estudos feitos mostram composição em torno de 20 a 30% de hemicelulose, 30 a 40% de celulose e 20 a 30% de lignina, tais características podem variar de acordo com os locais de origem desse material, condições de solo, clima, tempo e estação do ano em que foram coletados.

TABELA 3-1 – COMPOSIÇÃO LIGNOCELULÓSICA DOS CACHOS VAZIOS DOS FRUTOS DA PALMA EM DIFERENTES REGIÕES DO MUNDO

| Composição | | | Origem | Referência |
|--------------|------------------|-------------|-----------|------------------------------------|
| Celulose (%) | Hemicelulose (%) | Lignina (%) | | |
| 44,5 | 26,5 | 19,1 | Malásia | Yunus et al. 2010 |
| 43,8 | 35 | 16,4 | Malásia | Hamzah, Idris; Shuan 2011 |
| 13,75 | 12,79 | 7,79 | Colômbia | Piarpuzán, Quintero; Cardona, 2011 |
| 34,3 | 21,8 | 21,5 | Cingapura | Zhang et al. 2012 |
| 39,8 | 17,3 | 28,8 | Malásia | Kim; Kim, 2013 |
| 32,14 | 29,05 | 24,38 | Malásia | Sidik, Ngadi e Amin. 2013 |
| 37,26 | 14,62 | 31,68 | Indonésia | Sudiyani et al 2013 |
| 30,41 | 20,70 | 35,94 | Indonésia | Kristiani et al. 2015 |
| 36,8 | 19,3 | 17,9 | Malásia | Tan et al. 2013 |
| 29,6 | 18,8 | 22,9 | Benin | Chiesa; Gnansounou 2014 |
| 28 | 24,12 | 19,96 | Brasil | Medina et al. 2016 |
| 35,3 | 18,4 | 23,2 | Malásia | Tan et al. 2016 |

FONTE: A autora (2016)

A TABELA 3-1 permite concluir que, nos países asiáticos, o material residual analisado possui maiores teores de celulose e apresenta composição diferente daqueles analisados em países da América e África.

3.2. ESTRUTURAS LIGNOCELULÓSICAS

A utilização de resíduos lignocelulósicos para produção do etanol de segunda geração já é uma realidade, além de poder ser utilizado também para outros fins de biorrefinaria, tais como produção de ácidos orgânicos e enzimas (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). Esses resíduos são usualmente queimados nas indústrias de origem, sendo uma pequena quantidade destinada à produção de combustíveis ou à prática de *mulching*. Eles podem dar origem a três diferentes fontes de energia, por via termo ou bioquímica: biodiesel e bioetanol, biogás e eletricidade (MENON; RAO, 2012).

A estrutura lignocelulósica é uma macroestrutura firme e complexa que promove a sustentação e rigidez do tecido dos vegetais. Tem como função atuar como defensora de ataques microbianos às plantas, sobretudo as superiores. Sua composição é predominantemente celulose, hemicelulose e lignina, além de algumas também possuírem pectinas; e todas, em maior ou menor grau, contêm extraíveis em éter, etanol e água, tais como lipídeos e pigmentos e de algumas cinzas (ZAMANI, 2014; SARI et al., 2015; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

Os lignocelulósicos podem ser classificados em quatro grupos: os resíduos de florestas, resíduos sólidos urbanos, papel, e resíduos de cultivos e agroindustriais. Sua composição química é estimada, em base elementar, em 48% de carbono, 6% de hidrogênio, 45% de oxigênio e uma pequena quantidade de material inorgânico. Essa composição, entretanto, é muito variável, devido a fatores genéticos e ambientais (BALAT, 2011). Em termos de macromoléculas, a composição varia entre 30 e 50% de celulose, 15 a 35% de hemicelulose e 10 a 35% de lignina, a depender do tipo de vegetal (ZAMANI, 2014).

A matriz formada pelas três estruturas é intrincada e sua interação forma uma estrutura única. A cadeia de celulose, por possuir uma grande quantidade de hidroxilas, forma pontes de hidrogênio fortes, que dão origem à estrutura cristalina do polímero, que confere sustentação às plantas. Entremeadas à sua volta estão a hemicelulose e a lignina (ZAMANI, 2014).

A hemicelulose é também um polissacarídeo, porém sua estrutura não é cristalina e resistente como a celulose, sendo esta composta de subunidades de hexoses e a aquela de unidades mistas de pentoses e hexoses. A lignina, por sua vez, é um polímero de subunidades fenólicas (WERTZ; BÉDUÉ, 2013).

3.2.1. Lignina

A estrutura polifenólica da lignina tem origem a partir de três moléculas base: o álcool trans-coniferílico, o álcool trans-sinapílico e o álcool trans-cumárico. Esses álcoois dão origem aos monômeros da estrutura da lignina, e, quando na estrutura, são denominados hidroxifenil, (unidades H), guaiacil (unidades G) e siringil

(unidades S), respectivamente. O polímero gerado não é único e varia entre espécies, entre cultivares e até entre indivíduos do mesmo cultivar (HATAKEYAMA; HATAKEYAMA, 2009; WERTZ; BÉDUÉ, 2013; LIMA et al., 2016). Entende-se que não há uma estrutura realmente definida para a lignina, mas que ela é um material heterogêneo e de difícil caracterização completa, sendo então possível classificá-la de acordo apenas com os seus precursores (HATAKEYAMA; HATAKEYAMA, 2009).

A lignina é o segundo polímero mais abundante na Terra. Nos vegetais, atua na sustentação e manutenção da integridade celular, sendo a principal barreira entre micro-organismos - e suas enzimas - e a celulose. Tem também função de condução de seiva, impermeabilidade e rigidez (PILATE; DEJARDIN; LEPLÉ, 2012).

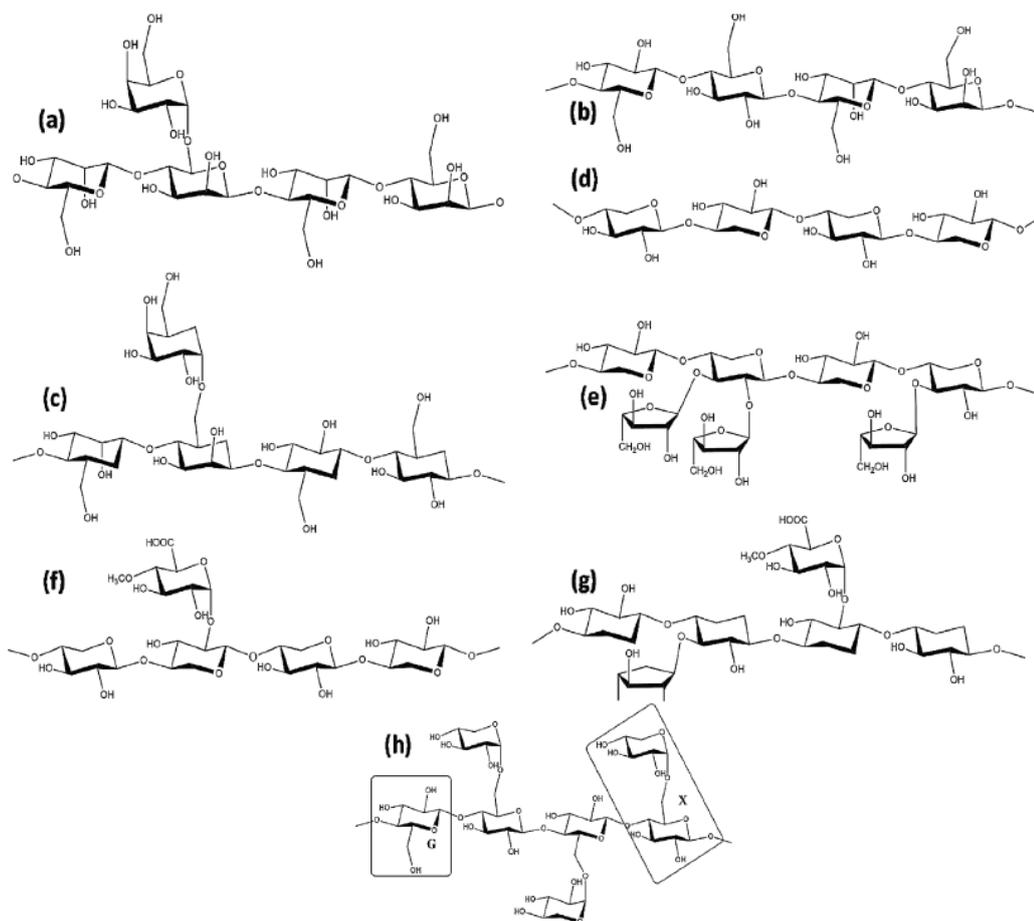
As ligninas presentes nos materiais lignocelulósicos podem ser solubilizadas e utilizadas na obtenção de bioprodutos, embora essa produção seja dificultada pela grande heterogeneidade das ligninas nos diversos materiais. Para a indústria que utiliza as hemiceluloses e a celulose como substratos, encontrar um meio de agregar valor à lignina é uma grande vantagem, uma vez que esta é utilizada apenas como fonte de energia nos processos atualmente (ZAMANI, 2014) e tem potencial para geração de outros produtos, tais como o biometano, nanopartículas com as mais diversas aplicações (ROOPAN, 2017; FIGUEIREDO et al., 2018; MATTINEN et al., 2018), resinas (JABLONSKIS et al., 2018), além de ligninases e diversos biopolímeros (CALVO-FLORES et al., 2015). As ações antimicrobianas e antioxidante das ligninas, devido à sua estrutura fenólica, também têm levado a estudos no desenvolvimento de aplicações médicas e farmacêuticas (CALVO-FLORES et al., 2015).

O interesse em dar um destino mais rentável à lignina se sobressai quando o teor de lignina na biomassa é elevado, fator que torna mais difícil a obtenção dos produtos celulósicos (SCHROYEN et al., 2015). Dentro de suas aplicações industriais, a heterogeneidade das ligninas apresenta vantagens e desvantagens, sendo o principal ponto positivo a maior variedade de produtos que podem ser obtidos em relação aos obtidos da matriz de petróleo. A principal desvantagem é a quantidade de tecnologias necessárias para obter esses produtos (DALE; KIM, 2006; CHERUBINI; STROMMAN, 2011).

3.2.2. Hemiceluloses

A estrutura das hemiceluloses é muito variável, assim como a da lignina, sendo, diferentemente da celulose, um heteropolissacarídeo amorfo e com cadeias curtas (MUSSATO; TEIXEIRA, 2010; NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018). Compostas de pentoses e hexoses, elas podem possuir em sua composição xilanas, mananas, glucomananas e xiloglucanas, além de estruturas mistas e polissacarídeos que também podem ser encontrados nas pectinas, tais como as arabinanas (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Essas definições, contudo, não são unanimidade entre pesquisadores da área, sendo possível encontrar referências que incluam os polímeros pécticos no grupo das hemiceluloses (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018). Outras alterações estruturais da hemicelulose ocorrem em suas cadeias laterais, que variam em tipos, distribuição, localização e distribuição de ligações glicosídicas (EBRINGEROVÁ, 2006). Algumas das diversas estruturas das hemiceluloses podem ser vistas na FIGURA 3.7:

FIGURA 3-6 – EXEMPLOS DE ESTRUTURAS DIVERSAS PARA A HEMICELULOSE



FONTE: (NAIDU, HLANGOTHI; JOHN, 2018).

LEGENDA: (a) – galactomananas; (b) – glucomananas;
 (c) – galactoglucomananas; (d) – xilana (homopolimérica);
 (e) – arabinoxilana; (f) – glucoroxilana; (g) – arabinoglucana;
 (h) – xiloglucana

O polímero hemicelulósico possui grau de polimerização em torno de 200 unidades monoméricas (SUN et al., 2016) e, apesar de aparentarem ser amorfas e sem alto grau de organização, as hemiceluloses geralmente parecem apresentar orientação na mesma direção das microfibrilas de celulose (SJÖSTRÖM, 1993) A estrutura das hemiceluloses é caracterizada pela presença de uma ligação glicosídica β (1 \rightarrow 4) em configuração equatorial entre suas subunidades (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Dentre os polímeros que compõe as hemiceluloses, o mais comum é a xilana, estrutura composta de unidades de xilose (β -D-xilopiranosil) conectadas, assim como as unidades de celulose, por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) (SUN et al., 2016), além de também poder apresentar unidades de arabinose na sua estrutura (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018). Os monômeros precursores das hemiceluloses são sintetizados a partir de modificações enzimáticas sobre a glicose formada no processo de fotossíntese (SJÖSTRÖM, 1993).

Outra estrutura relativamente comum são as mananas, polímeros geralmente compostos por unidades de glicose e manose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4), podendo conter também galactose, a depender do tipo de planta. As mananas são os componentes majoritários das hemiceluloses das coníferas e podem ser classificadas em mananas lineares, glucomananas, galactomananas e galactoglucomananas (MALGAS; VAN DYK; PLETSCHE, 2015; CHAUHAN; GUPTA, 2015). As hemiceluloses são facilmente hidrolisáveis por ácidos aos seus componentes primários (SJÖSTRÖM, 1993).

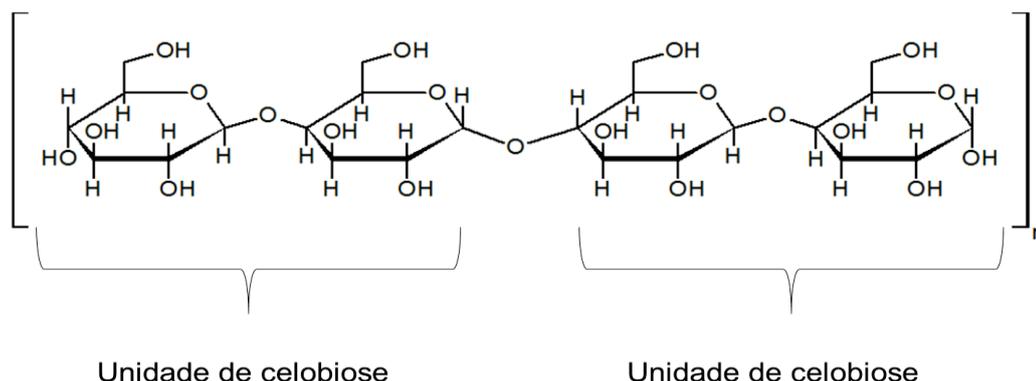
Industrialmente, as hemiceluloses têm apresentado aplicações como agente emulsificante e estabilizante, além de envoltório e embalagem para alimentos, devido à sua capacidade de formação de biofilmes. Porém, essas características foram identificadas tardiamente em relação à identificação da celulose, uma vez que as hemiceluloses são facilmente degradáveis durante a maioria dos processos de obtenção de celulose (ZAMANI, 2014).

3.2.3. Celulose

Biologicamente, a celulose pode ser definida como o polímero estrutural mais importante da parede celular vegetal e mais abundante no planeta. Dentro da célula, ela está ligada a moléculas de hemicelulose e ambas estão ligadas à lignina, formando o que se conhece como complexo lignocelulósico (HASUNUMA et al., 2013; JUTURU; WU, 2014). A primeira observação da estrutura fibrosa da celulose e suas características basais ocorreu em 1838 pelo químico francês Anselme Payen (McNAMARA; MORGAN; ZIMMER, 2015).

A celulose é a principal responsável pela manutenção da estrutura das plantas. Suas unidades de repetição são dímeros de glicose, denominados celobiose. Não é considerada a glicose como unidade devido à orientação espacial das moléculas. Cada dímero está posicionado a 180° da próxima unidade de repetição, fazendo com que a conformação das moléculas de glicose não seja igual (FIGURA 3-8). A união das moléculas de glicose na polimerização da celulose remove uma molécula de água, de modo que as unidades monoméricas são denominadas unidades de anidroglicose (QI, 2017; McNAMARA; MORGAN; ZIMMER, 2015, McDONALD; ROOKS; MCCARTHY, 2012). O grau de polimerização da celulose pode variar de algumas centenas até dezenas de milhares, e é significativamente variável entre os organismos (SUN et al., 2016; LI et al., 2014).

FIGURA 3-7 – ESTRUTURA DA CELULOSE, COM UNIDADES DE CELOBIOSE



Fonte: A autora (2017)

Quimicamente, as unidades da glicose estão unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). Com uma disposição de alta linearidade, a celulose possui uma tendência de formar pontes de hidrogênio intra e intermoleculares. Sua estrutura é muito resistente, apresentando alto grau de cristalinidade na maior parte da unidade polimérica, ainda assim apresentando zonas amorfas. Essa construção se organiza em microfibrilas, com cerca de 15 a 45 cadeias, que por sua vez, se organizam em fibrilas, cujos feixes são chamados de fibras. Dada essa configuração fibrosa e sua alta capacidade de formação de pontes de hidrogênio, as moléculas de celulose apresentam baixa solubilidade na maioria dos solventes (SJÖSTRÖM, 1993;

JUTURU; WU, 2014; SUN et al., 2016). Sua insolubilidade é característica a partir de um grau de polimerização de seis a oito e a agregação intermolecular é formada por ligações de Van der Waals (McNAMARA; MORGAN; ZIMMER, 2015).

As características de cristalinidade da celulose e suas fortes ligações intra e intermoleculares também lhe conferem outras propriedades, tais como viscosidade quando em solução, capacidade de formar estruturas fibrilares e dificuldade de fusão (QI, 2017).

A biossíntese da celulose nos vegetais se inicia com a produção de glicose, gerada na fotossíntese. A polimerização é catalisada por um complexo de enzimas celulose sintase, atrelado à membrana de todos os organismos cuja estrutura é celulósica. Entre os reinos desses organismos existe uma grande variação na estrutura da celulose sintase, apesar desta manter a estrutura do sítio catalítico para todos eles (LI et al., 2014). A celulose sintase é uma glicosiltransferase, que catalisa a formação de cadeias lineares a partir do precursor, que é um açúcar ativado, (nucleosídeo UDP-D-glicose), este é formado quando a glicose se liga a um nucleotídeo trifosfato (LELOIR, 1970, SJÖSTRÖM, 1993, McNAMARA; MORGAN; ZIMMER, 2015).

Várias formas polimórficas da celulose podem ser obtidas, sendo a mais comum delas a celulose I, ou celulose nativa, outras formas (polimorfos II, III, IV) são obtidas após tratamentos químicos (KULASINSKI et al., 2014; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). A celulose I é formada nas membranas dos seres vivos, tal como descrito anteriormente, em um arranjo extremamente específico de proteínas denominado complexo terminal, onde várias celulose-sintases são arranjadas em diferentes estruturas. Nas plantas superiores, esse arranjo possui um formato já conhecido, de rosa, cujas divisões (similares às pétalas) atravessam a membrana e o citoplasma das células. A composição proteica total dessa estrutura não é muito bem conhecida, mas sabe-se que ela é responsável pela síntese simultânea de diversas cadeias de glucanas (LI et al., 2014; SAXENA; BROWN JR, 2005).

Em nível industrial, a celulose apresenta um papel muito importante na produção de polpa e papel, indústria têxtil e de alimentos, nesta última atuando principalmente como espessante, e ainda na produção de nanocelulose (ZAMANI, 2014). A participação da celulose na indústria têxtil figura na utilização do algodão,

cuja estrutura é determinada como sendo 100% celulose. Além disso, a celulose, dadas suas características e abundância, aparece como fonte majoritária de carboidratos fermentescíveis para a produção de biocombustíveis alternativos.

3.3. BIORREFINARIAS

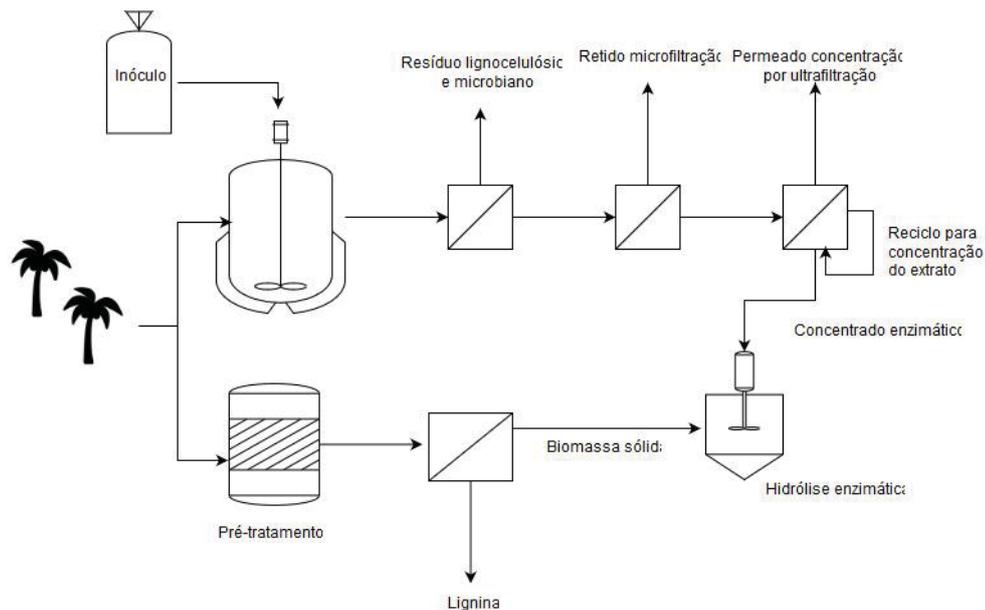
A utilização de biomassa vegetal, ou lignocelulósica, em processos industriais é bem conhecida e difundida em vários âmbitos. Essa biomassa pode ser quimicamente definida como material cuja composição básica é carbono, hidrogênio e oxigênio (YAMAN, 2004). Os processos de produção de moléculas de interesse industrial e energia utilizando biomassa como matéria-prima são definidos como processos de biorrefinarias (PETRUCCIOLI et al., 2011). Nesse contexto, moléculas para as indústrias de biocombustíveis, de alimentos, farmacêutica, química, de polpa e papel e de polímeros podem ser produzidas por biorrefinarias (CHERUBINI, STROMMAN, 2011).

A obtenção de produtos de biorrefinaria se dá através do aproveitamento de estruturas da biomassa lignocelulósica, que são polímeros presentes na parede celular dos vegetais, tais como celulose, hemicelulose, lignina e pectinas. Esses produtos podem ser classificados em dois grupos básicos: aqueles que são obtidos diretamente dos polímeros lignocelulósicos, e aqueles que são obtidos a partir dos produtos de hidrólise desses polímeros (ZAMANI, 2014).

Os estudos de agregação de valor aos resíduos agroindustriais têm como objetivo incluir esse material - inicialmente descartado e/ou incinerado - em processos de biorrefinaria, alcançando um aproveitamento do resíduo associado à obtenção de um produto sustentável e de baixo custo. A biomassa lignocelulósica, em conjunto com as demais fontes de energia renovável, tem se tornado cada vez mais atrativa na substituição dos combustíveis fósseis. Dentre tais fontes, a utilização deste tipo de biomassa tem destaque por possuir menor custo efetivo e ainda permitir a utilização de resíduos, que estão presentes em grande quantidade no planeta (GUPTA; VERMA, 2015).

Dentro do contexto apresentado neste trabalho, a FIGURA 3-9 mostra um esquema de um processo de biorrefinaria para o aproveitamento de biomassa residual de palma oleaginosa para produção e aplicação *on-site* de enzimas:

FIGURA 3-8 – ESQUEMA DE PROCESSO DE BIORREFINARIA PARA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO ON-SITE DE ENZIMAS (HEMI)CELULOLÍTICAS



FONTE: A autora (2018)

Na FIGURA 3-9 são consideradas as operações unitárias do processo, que incluem bioprocesso de produção das enzimas utilizando o resíduo de palma oleaginosa como fonte de carbono, seu *downstream* em processos sequenciais de separação por filtração e a aplicação desse concentrado enzimático em biomassa de palma oleaginosa pré-tratada para produção de açúcares fermentescíveis.

3.4. CELULASES

A hidrólise enzimática da celulose ocorre através das celulases, ou enzimas celulolíticas. Essa hidrólise é conduzida por um complexo enzimático composto, principalmente, por três diferentes enzimas, as endocelulases, exocelulases ou celobiohidrolases e celobiasas ou β -glucosidases, de forma que as três atuam em

sinergia, cada uma possui um mecanismo de ação e é responsável por uma etapa durante todo o processo hidrolítico (SINGHANIA et al., 2010; SIQUEIRA et al. 2020a). De modo geral, as três são responsáveis por clivar as ligações glicosídicas $\beta 1 \rightarrow 4$ das moléculas de glicose e dos seus respectivos produtos de degradação (JUTURU; WU., 2014).

Além de aplicadas em biocombustíveis, as celulasas possuem ainda outras diversas aplicações: são utilizadas na extração e clarificação de bebidas (RAJU; BAWA, 2006), no amolecimento e mudança de coloração de jeans (JUTURU; WU, 2014), alimentação animal (JACOBS; MCALLAN, 1991; SATHYA; KHAN, 2014), reciclagem de papel (LEE et al, 2016; PATHAK; BHARDWAJ; SINGH., 2014), decomposição de resíduos (HAN; HE, 2010) e indústria de detergentes.

As celulasas apresentam uma característica peculiar quando comparadas com as demais enzimas, uma vez que degradam um substrato insolúvel, o faz com que, em sua estrutura, possuam uma estrutura denominada domínio de ligação (CBD – *cellulose binding domain*), que normalmente está próxima ao domínio catalítico, ligada por um peptídeo flexível de ligação (VIKARI, 2003; WILSON, 2011). O domínio de ligação conecta-se ao substrato de modo a permitir a atuação do domínio catalítico (JUTURU; WU, 2014). O mecanismo de ação pode se dar por duas vias: o mecanismo de retenção e o mecanismo de inversão. Ambos são caracterizados por um ataque nucleofílico por parte dos resíduos de aminoácidos do domínio catalítico da enzima sobre a ligação glicosídica (SIQUEIRA et al., 2020; MOSIER et al., 1999).

Nas células microbianas, elas podem ser produzidas de forma complexada ou não complexada. Quando originada de bactérias anaeróbias, são complexadas e produzidas em uma estrutura denominada celulosoma; em que as enzimas são ligadas à uma estrutura da unidade proteica. Essa ligação é mantida graças às interações não covalentes existentes entre o módulo de acoplamento e os módulos complementares. Ainda na estrutura do celulosoma existe um domínio capaz de se ligar à carboidratos, que complexa a enzima à superfície da celulose. Já a forma não complexada das celulasas é produzida por fungos e secretada no meio para degradação da celulose (HASUNUMA et al., 2013).

A hidrólise se inicia pelas regiões amorfas da celulose, que são de mais fácil acesso para as enzimas. De acordo com sua estrutura e função no complexo celulolítico, as celulases atuam catalisando diferentes reações que conduzem desde a quebra da estrutura amorfa da celulose até a conversão da celobiose em unidades de glicose.

3.4.1. Endoglucanases

As Endo β -1,4-glucanases (EG ou Endo-1,4- β -D-glucana 4-glucanohidrolases EC 3.2.1.4) (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005) são responsáveis pela clivagem das regiões amorfas da celulose, liberando como produtos celo-oligossacarídeos com diferentes quantidades de monômeros e terminais não redutores (LYND et al., 2002; JUTURU; WU, 2014). Devido à sua estrutura, que contém pequenos *loops* e é relativamente aberta, elas podem se ligar diretamente ao polímero através do seu domínio de ligação e realizar o processo de catálise (UBHAYASEKERA et al., 2005).

3.4.2. Exoglucanases (celobiohidrolases)

Agindo em sinergia com as endoglucanases, as exoglucanases (CBH 1,4- β -D-glucana celobiohidrolases EC 3.2.1.91) clivam os oligossacarídeos liberados, em suas extremidades redutoras ou não redutoras, gerando as celobioses. A reação ocorre quando o substrato se insere na estrutura da enzima, que é espiralada, assemelhando-se a um túnel (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005; UBHAYASEKERA et al., 2005; JUTURU; WU, 2014). As celobiohidrolases podem ser de dois tipos, as que clivam as cadeias com terminais redutores e as que clivam os terminais não redutores. As celobioses liberadas são então clivadas em glicose pelas celobioses ou β -glucosidases (JUTURU; WU, 2014).

3.4.3. β -glucosidases

As celobiasas, ou β -glucosidases (BG EC 3.2.1.21) atuam na quebra da ligação glicosídica presente entre as unidades de glicose da celobiose e outros sacarídeos de baixa polimerização e, finalmente, gerando o produto final da reação, que é a glicose (LYND et al., 2002). Dentro do complexo enzimático, as β -glucosidases são as chamadas enzimas limitantes, uma vez que é facilmente inibida tanto pelo produto quanto pelo substrato (SINGHANIA et al., 2011).

3.5. HEMICELULASES

As hemicelulases são, assim como as celulases, enzimas hidrolíticas responsáveis pela conversão de polissacarídeos em açúcares de menores graus de polimerização. Devido à variedade de composições das hemiceluloses, conforme já descrito, as hemicelulases são ainda divididas em grupos, tais como as xilanases, responsáveis pela clivagem dos polímeros de xilana e as mananases, que clivam polímeros com estrutura principal de mananas.

Possuem mecanismo de ação similar ao das celulases, de modo que vários grupos de enzimas atuam sinergicamente para que haja a quebra completa dos polímeros de hemiceluloses, tais como as endo-xilanases (EC.3.2.1.8), β -xilosidases (EC. 3.2.1.37), α -arabionofuranosidase (E.C.3.2.1.55), acetilxilano esterase (E.C.3.1.1.72) (JUTURU; WU, 2012).

3.5.1. Xilanases

As xilanases são enzimas que degradam os polímeros de xilana, estruturas predominantes na maioria das hemiceluloses. Elas são, assim como as celulases, um grupo amplo de enzimas que atuam em sinergia, sendo as principais as endo-xilanases e as β -xilosidases. A estrutura das xilanases também apresenta certa semelhança com a estrutura das celulases, por apresentarem um domínio de ligação

(XBD - *xilan binding domain*), assim como as celulases apresentam o CBD, que tem como objetivo ligar a enzima à estrutura do polímero que será degradado (JUTURU; WU, 2012; VIIKARI, 2003).

As endoxilanases são as enzimas responsáveis pela clivagem da xilana a xilo-oligômeros, enquanto as β -xilosidases e arabinofurosidases atuam convertendo esses oligômeros em unidades de xilose (JUTURU; WU, 2012; ROSMINE et al., 2017).

As primeiras aplicações das xilanases tiveram como objetivo substituir o gás cloro em processos de clareamento nas indústrias de polpas (VIIKARI, 2003). Atualmente, são também utilizadas na indústria de alimentos para clarificação de sucos e auxílio na extração de polpas, alimentação animal, biocombustíveis, tratamento de resíduos, detergentes e indústria têxtil (ROSMINE et al, 2017).

A produção de xilanases por micro-organismos pode se dar tanto por bactérias quanto por fungos (JUTURU; WU, 2012), sendo sobretudo as oriundas de fungos filamentosos as mais comuns. Linhagens do gênero *Aspergillus*, com destaque para o *Aspergillus niger*, são frequentemente reportadas como produtoras dessas enzimas. Espécies de *Penicillium* (LIAO et al., 2015) já foram estudadas como produtoras de xilanases.

3.5.2. Mananases

As mananas podem ser hidrolisadas por diversas enzimas agindo sinergicamente, tais como as mananases, glucosidases, manosidases e galactosidases. As β -mananases (EC. 3.2.1.78) são responsáveis pelo início da hidrólise das mananas, randomicamente clivando as ligações glicosídicas e liberando β -1,4-mano-oligômeros como manobioses e manotrioses. As β -manosidases (EC 3.2.1.25) atuam clivando as ligações dos manosídeos, liberando manose das terminações não redutoras das mananas e dos oligossacarídeos de mananas. Podem atuar nesse processo ainda glucosidades e galactosidases (MALGAS; VAN DYK; PLETSCHKE, 2015).

3.4. PRODUÇÃO DE ENZIMAS (HEMI)CELULOLÍTICAS

Além de utilizados na hidrólise de material celulósico para produção de açúcares fermentescíveis, os resíduos lignocelulósicos também têm sido estudados como substratos para produção das enzimas (hemi)celulolíticas. Essa produção pode ocorrer via fermentação em estado sólido ou submersa. A utilização desses resíduos na produção das enzimas tem por objetivo reduzir os custos de produção, de forma a baratear o produto final (HANSEN et al., 2015).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos em torno das fermentações em estado sólido, uma vez que estas levam a maiores concentrações do produto. Além disso, têm vantagem quando são empregados fungos filamentosos por se mostrar semelhante ao seu habitat natural, com quantidade de água livre reduzida. A formação de micélio é tanto integrativa ao meio quanto aérea (BIESEBEKE et al., 2002; HANSEN et al., 2015). Entretanto, industrialmente, a produção de enzimas – e da maioria dos bioprodutos – ocorre via fermentação submersa, uma vez que esta é mais facilmente aplicável e pode ser controlada de forma mais efetiva em termos de seus parâmetros físico-químicos (KRISHNA, 2005; HANSEN et al., 2015).

No caso da utilização de substratos não solúveis como fontes de carbono, uma alternativa estudada à fermentação em estado sólido, são os processos fermentativos semissólidos, que utilizam sólidos em suspensão no meio líquido, como já é aplicado na produção de vinhos, por exemplo (ZOU et al., 2016). Para a produção de enzimas, já foram utilizados diversos substratos nessas condições, tais como o bagaço de cana-de-açúcar (CUNHA; BADINO; FARIAS, 2017), farelo de trigo (HAN et al., 2017) e farelo de arroz (INOUE et al., 2016).

3.4.1. Micro-organismos produtores

A maioria dos estudos reportados em literatura utilizam fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* como produtores das enzimas (TABELA 3-2), sendo também aplicados na produção industrial de celulasas. Entretanto, outros

gêneros têm sido estudados, ainda que em menor grau, tais como os *Penicillium* (JING et al., 2015; JUNG Y. et al., 2015; SAINI et al., 2015).

TABELA 3-2 – ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS (HEMI)CELULOLÍTICAS UTILIZANDO FUNGOS FILAMENTOSOS

| Micro-organismo | Substrato | Enzimas | Atividade enzimática | | | Referência |
|------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | | FPase | CMCase | Xilanase | |
| <i>A. niger</i> | Resíduos de cozinha | Celulases | 17 FPU·g ⁻¹ | 310 U·g ⁻¹ | ----- | Bansal et al., 2012 |
| <i>A. niger</i> | Vagem de ervilhas | Celulase e xilanase | 41,07 FPU·g ⁻¹ | 480 U·g ⁻¹ | 2800 U·g ⁻¹ | Sharma R. et al., 2015 |
| <i>A. niger</i> | Farelo de trigo | Celulase | 7 FPU·g ⁻¹ | 17,4 U·g ⁻¹ | ----- | Hemansi et al, 2018 |
| <i>A. fumigatus</i> | Tronco de palma oleaginosa | Celulase e xilanase | 3,36 FPU·g ⁻¹ | 54,27 U·g ⁻¹ | 418,70 U·g ⁻¹ | Ang et al, 2013 |
| <i>A. terreus</i> | Palha de arroz | Celulases | 10,96 FPU·g ⁻¹ | ----- | ----- | Narra et al, 2012 |
| <i>T. harzianum</i> | Bagaço de cana | Celulase e xilanase | 2,27 FPU·mL ⁻¹ | ----- | 106,40 U·mL ⁻¹ | Delabona et al. 2016 |
| <i>T. reesei</i> | Bagaço de cana | Celulase e xilanase | 3,25 FPU·g ⁻¹ | 4,14 U·g ⁻¹ | 366,91 U·g ⁻¹ | Gasparotto et al., 2015 |
| <i>P. janthinellum</i> | Palha de trigo | Celulase e xilanase | 1,85 FPU·mL ⁻¹ | 39 U·mL ⁻¹ | 42,2 U·mL ⁻¹ | Sharma B. et al, 2015 |
| <i>P. funiculosum</i> | Bagaço de cana-de-açúcar | Celulases | 0,91 U·mL ⁻¹ | 11,12 U·mL ⁻¹ | ----- | Maeda et al, 2013 |

FONTE: A autora (2017)

As tentativas para redução dos custos de produção das enzimas têm sido exploradas devido ao alto custo das preparações enzimáticas aplicadas industrialmente. O uso dos substratos residuais surge como alternativa, uma vez que permitem a produção das enzimas sem a necessidade de compra de substratos mais caros, como a celulose pura. Além disso, por ser material oriundo da agricultura, o resíduo lignocelulósico também pode ser rico em minerais requeridos pelo micro-organismo para crescimento e produção das enzimas, reduzindo a necessidade de suplementação dos meios de fermentação. Esses minerais variam desde os macroelementos para crescimento até os elementos traço (HANSEN et al., 2015). Vários substratos alternativos já foram estudados para a produção de

celulases, desde os resíduos lignocelulósicos agroindustriais como bagaço de cana (GASPAROTTO et al., 2015; DELABONA et al., 2016) até resíduos de cozinha (BANSAL et al., 2012) e domésticos (LIBARDI et al., 2017).

3.5. PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS (HEMI)CELULOLÍTICAS

A competitividade de um produto biológico está relacionada à quantidade e complexidade dos processos necessários para sua aplicação efetiva, estabilidade às condições de processo, transporte e armazenamento. Essas condições são características de uma série de processos definidos como *downstream*, um conjunto de etapas que transformam uma biomolécula produzida em um produto aplicável e/ou comercializável.

Usualmente, um processo de *downstream* pode seguir guias *heurísticos* de processos, a depender da perspectiva de aplicação. Porém, para algumas moléculas – tais como as enzimas –, podem ser utilizados processos já consolidados que funcionam de forma eficiente com pouco ou nenhum dano à atividade biológica. Esses processos já foram extensivamente estudados e estão reportados em artigos, patentes e processos industriais. Ainda assim, é necessário cuidado na escolha dos processos pós-produção, vários fatores devem ser bem pensados antes mesmo do início da produção (de CARVALHO et al., 2017).

3.5.1. Separação celular

Em escala laboratorial, a separação do mosto fermentado pode se dar por filtração simples ou por centrifugação, a depender das características do material produzido. Um caldo fermentado produzido com substratos semissólidos de baixa granulometria, por exemplo, pode apresentar presença de materiais particulados capazes de passar pelos poros de alguns filtros, e de causar entupimento desses poros a partir de formação de torta. Nesse caso, a centrifugação seria um procedimento mais adequado.

A separação celular é dependente também do objetivo que se tem ao separar mosto celular de caldo fermentado. Se o bioproduto de interesse for extracelular, como é o caso das (hemi)celulases e pectinases produzidas por fungos filamentosos, descartam-se as células e é recuperado o sobrenadante; se o produto for intracelular, é descartado o sobrenadante e mantido o mosto celular, que será lisado para recuperação (CENTANNI; ROY, 2017).

3.5.2. Filtração tangencial

Já bastante estudada e utilizada na separação de diversas biomoléculas (DIXON; WILKEN, 2017; SHUKLA et al., 2017; ROYCE; LIDERFELT; ROBINSON, 2018; MUKHERJEE, 2019; ZACCARIA et al., 2019), a filtração tangencial é extremamente vantajosa quando comparada à filtração convencional, uma vez que o material a ser filtrado flui paralelamente à membrana, reduzindo a formação de torta. Sua alta eficiência permite que seja um processo aplicado em escala de microfiltração, com poros em μm e até mesmo de ultrafiltração, como poros na escala de Daltons (Da), e nanofiltração, aplicada em sistemas de osmose reversa. Adicionalmente, esse processo pode ser escalonado sem grandes entraves, mantendo o *cut-off* determinado em laboratório, modificando-se apenas as condições de execução, que devem ser otimizadas quando do escalonamento (SEADER; HENLEY; ROPER, 2011; HARRISON et al. 2015; de CARVALHO et al, 2017).

A eficiência do processo é dependente de algumas variáveis, tais como a pressão aplicada, a resistência da membrana e das partículas que aderem à superfície da membrana, que se somam. Ainda assim, essas partículas podem ainda ser removidas pelo fluxo de líquido que permeia continuamente a superfície da membrana (de CARVALHO et al., 2017).

3.5.2.1. Microfiltração e ultrafiltração

A separação de componentes potencialmente prejudiciais ou contaminantes e isolamento das moléculas alvo pode ser realizada utilizando uma ferramenta já bastante difundida e utilizada industrialmente para a separação de diversos bioprodutos: a microfiltração em fluxo tangencial, que pode ser realizada em membranas de várias configurações. Esse tipo de separação é considerado essencial aos processos bioquímicos devido ao seu menor custo de processo quando comparado a outros métodos, baixo efeito de *fouling* e disponibilidade de membranas com várias capacidades de fluxo (SINGH; PURKAIT, 2019). Também são utilizadas filtrações através de membranas de microporos, em que a passagem ou retenção do material de interesse é realizada através de centrifugação. A microfiltração pode também ser utilizada em processos *upstream*, nos quais é aplicada para filtração de células inteiras e fragmentos celulares; nesse caso, as membranas possuem poros entre 0,05 μm e 1,0 μm (MERCK-MILLIPORE, 2003; DAVIS, 2019).

Além de isolar a proteína alvo removendo compostos de alto peso molecular, também é ideal que seja feita uma pré-purificação do produto microfiltrado, utilizando sistemas de ultrafiltração com *cut-off* pré-determinado, no qual a maior parte da proteína-alvo fique retida e os componentes de menor peso molecular sejam removidos. A remoção de proteínas que não sejam de interesse para o produto é essencial para o aumento de sua pureza. A ultrafiltração também pode ser utilizada para a concentração da(s) proteína(s) alvo, a partir de refluxo do extrato sobre a mesma membrana. Tais processos de separação e concentração são efetivos no *downstream* de vários bioprodutos (MAEDA et al., 2013; POLETTO et al., 2015; HUNG; LIU, 2018; KHEMAKHEM et al., 2017; LIBARDI et al. 2019).

3.6. FORMULAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS

O extrato enzimático clarificado e recuperado, para ser aplicado ou comercializado deve ser estável e ter uma vida de prateleira viável à sua aplicação. Vários fatores influenciam a estabilidade de um produto enzimático. Como este é

essencialmente composto de proteínas, está suscetível à desnaturação ou formação de agregados. Fatores como pH do produto, temperatura de armazenamento, estado iônico, umidade relativa e contaminação microbiana são frequentemente causadores da desestruturação e/ou perda de atividade biológica de uma proteína (YANG et al., 2018).

A estabilidade que um produto enzimático demanda pode ser obtida a partir da inclusão de aditivos com funções diversas na formulação do produto. É, então, necessário definir quais e em que proporções devem ser utilizados no desenvolvimento do produto enzimático. O processo de formulação de uma enzima pode, muitas vezes, ser a etapa que irá conferir ao produto sua característica diferencial no mercado. Por isso, a nível industrial, aspectos dessa formulação são mantidos em segredo. (NUNES; PHILIPPS-WIEMANN, 2018). Isso se deve, mormente, ao fato de que os componentes utilizados na formulação têm o intuito de manter a atividade enzimática ao longo do tempo, evitando contaminações microbiológicas e desestabilização da estrutura da proteína.

No desenvolvimento de pesquisas e tecnologias, os diferentes tipos de formulações são estudados, tais como α -amilases na forma líquida (HAN, BASF ENZYMES, 2016), enzimas anti-inflamatórias na forma de pérolas ou cápsulas (imobilizadas) (YANG et al., 2018) e L-Asparaginase na forma sólida em nanopartículas (SHARMA; RATH; GOYAL, 2019).

O produto formulado pode ser apresentado em forma líquida ou em pó, a depender de sua aplicação e a forma em que apresenta maior estabilidade às intempéries e, conseqüentemente, maior vida de prateleira. Comercialmente, enzimas (hemi)celulolíticas são apresentadas na forma líquida, tais como a série Ctec e a Celluclast, ambas da *Novozymes*® (MILLIPORE-SIGMA, 2019a, b), que devem ser armazenadas sob refrigeração; ou ainda na forma de pó liofilizado, como é o caso das celulasas de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 e de *Aspergillus niger*, ambas da Sigma-Aldrich® (MILLIPORE-SIGMA, 2019c,d), que também devem ser mantidas sob refrigeração. Algumas delas devem, ainda, ser armazenadas congeladas, como é o caso da hemicelulase de *Aspergillus niger* da Sigma-Aldrich® (MILLIPORE-SIGMA, 2019e). As condições de armazenamento são determinadas

de modo que preservem, juntamente com os aditivos, a estrutura e atividade biológica das enzimas.

A aplicação do produto enzimático determina a pureza que deve apresentar e os tipos de aditivos que podem ser utilizados na formulação para manutenção das características desejadas. O uso desses materiais é regulamentado por órgãos governamentais, orientado por tipo de aplicação, uma vez que produtos que venham a ser utilizados em alimentos, fármacos e nutrição animal, precisam de maior cuidado, já que alguns desses compostos podem causar danos à saúde.

No Brasil, essa regulamentação é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Na Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 54, de 07 de outubro de 2014, a ANVISA descreve o regulamento técnico para produção de preparações enzimáticas para uso em alimentos (BRASIL, 2014a). Nessa RDC, é descrito que a formulação produzida por via microbiana não pode possuir resíduos de biomassa, além de que o produto deve ser “adequadamente caracterizado” e atender requisitos das especificações da *FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, divisão de segurança alimentar da Organização Mundial de Saúde; do *Food Chemicals Codex*; ou da *Food and Drug Administration (FDA)*, órgão de regulamentação estadunidense. Já a Resolução RDC 53/2014 (BRASIL, 2014b) lista enzimas, aditivos e veículos autorizados para desenvolvimento de enzimas aplicáveis em alimentos.

Os aditivos são geralmente classificados de acordo com sua função no produto: se são estabilizantes, antimicrobianos, antieméticos, umectantes, crioprotetores. Tanto *handbooks* de produtos farmacêuticos e biotecnológicos quanto as próprias resoluções dos órgãos de regulamentação apresentam as funções de tais componentes nas formulações.

3.7. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O processo de conversão da celulose em açúcares pode ser realizado química ou bioquimicamente. A hidrólise química é realizada em meio ácido concentrado, enquanto a bioquímica é conduzida por enzimas: as celulasas. A

catálise ácida da degradação da celulose, porém, além de utilizar reagentes corrosivos em seu decorrer, demanda equipamentos complexos e ainda pode causar degradação de açúcares (MANSFIELD; ESTEGHALALIAN, 2003). Os açúcares oriundos dessa hidrólise podem ser purificados e utilizados como produto final, mas também (e mais frequentemente) atuam como substrato para a obtenção de outros bioprodutos (ZAMANI, 2014).

Os catalisadores responsáveis pela hidrólise enzimática da celulose são as enzimas celulolíticas, que atuam clivando as ligações $\beta 1 \rightarrow 4$ do polímero. É uma das etapas mais caras do processo de conversão da biomassa em etanol, sendo responsável por de 20 a 30% dos custos do processo (CHEN; FU, 2016).

A estrutura da matriz lignocelulósica tem grande influência sobre a hidrólise enzimática, uma vez que é muito complexa e, a depender de sua composição, dificulta o acesso das enzimas aos polissacarídeos (KARIMI; TAHERZADEH, 2016). Estudos comparativos indicam que o tratamento alcalino, responsável pela solubilização da lignina, favorece a liberação de açúcares quando comparado, por exemplo, aos tratamentos ácidos (MAITAN-ALFENAS et al., 2015).

A efetividade da hidrólise enzimática não depende apenas da capacidade de a enzima converter o substrato em produto, mas também de características da própria biomassa, dessa forma, os fatores que influenciam nesse processo são divididos em duas categorias: as características da enzima e as da biomassa (ALVIRA et al., 2010; SUN et al., 2016). Fatores como a presença dos demais polímeros da estrutura lignocelulósica, presença de inibidores oriundos dos pré-tratamentos, cristalinidade da celulose, área de contato (SUN et al., 2016) são características do substrato que afetam a hidrólise.

3.8. APLICAÇÃO DE ENZIMAS (HEMI)CELULOLÍTICAS NA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

Desastres ambientais e guerras de poder tem ocorrido intermitentemente devido ao consumo contínuo e atual dependência energética de combustíveis fósseis. Essa dependência é visível quando se apreciam os dados gerais de

consumo de combustíveis fósseis e parte-se do conhecimento de que eles não são renováveis. De acordo com dados do Banco Mundial (2014), a porcentagem do consumo mundial de combustíveis fósseis em relação ao total de combustíveis consumidos mostra ainda uma dependência de 80,8% em 2014 (THE WORLD BANK, 2014).

Uma das alternativas viáveis em curto prazo é a utilização da energia contida na biomassa vegetal para a geração de combustíveis. A produção de bioetanol é um exemplo desse processo. O bioetanol pode ser produzido a partir de três diferentes formas: materiais vegetais ricos em sacarose, como a cana-de-açúcar; matéria amilácea, como milho e mandioca; e, por fim, os materiais lignocelulósicos, como os farelos de milho, arroz, trigo etc. (SOCCOL et al., 2010; BALAT, 2011; BHUTTO et al., 2015).

O etanol produzido a partir do material lignocelulósico é denominado etanol celulósico ou de segunda geração. Ele é obtido a partir da fermentação de açúcares obtidos na hidrólise dos polissacarídeos componentes da biomassa vegetal – a hemicelulose e, sobretudo, a celulose (SOCCOL et al., 2010; ZAMANI, 2014; SGOILLOT; FAULDS, 2016). Esse etanol surge, inicialmente, como um apoio ao etanol de primeira geração, que já é produzido em larga escala no mundo. O etanol de segunda geração mostra-se vantajoso em relação ao de primeira geração, uma vez que este último, por vezes, demanda a utilização de matéria-prima que poderia ser destinada à produção de alimentos; (da SILVA et al., 2010; SOCCOL et al. 2011; DAYLAN; CILIZ, 2016). Ademais, de acordo com Daylan e Ciliz (2016), o etanol emite de 45 a 65% menos gases causadores do efeito estufa do que a gasolina.

3.8.1. Utilização de matéria-prima residual

O etanol 2G pode ser produzido a partir de resíduos agroindustriais que sejam compostos de material lignocelulósico, de modo que não comprometa a produção de alimentos – uma vez que esse é um dos pontos críticos para a produção de biocombustíveis –, e não ocupe maior espaço de cultivo (PETRUCCIOLI et al., 2011; SARI et al., 2015). Além disso, a utilização das matérias-primas residuais diminui o custo de produção, uma vez que a despesa com

o material de base é reduzida, e, sobretudo, reduz os impactos ambientais do descarte desse resíduo na natureza (BHATIA, JOHRI; AHMAD, 2012).

Estudos têm sido desenvolvidos com diversos resíduos industriais para verificar quais deles possuem potencial para produção em escala comercial do etanol 2G. As matérias-primas mais utilizadas para essa produção são a madeira, resíduos agroindustriais como espigas (CHANG et al., 2012) e palha de milho, sorgo, palha e bagaço de cana (da SILVA et al., 2010; NEVES; PITARELO; RAMOS, 2016), farelos de arroz (ROCHA et al., 2013) e trigo (SINGHANIA et al., 2014), cachos vazios de palma (KIM; KIM, 2013) e tâmaras e bagaço de agave, grammas perenes e resíduos domésticos. O uso direto dos resíduos (bioetanol 1G) também tem sido estudado, como por exemplo mucilagem de café (YADIRA et al., 2014), leite de coco e resíduo de suco de abacaxi (DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, TORRES-MUÑOZ; LÓPEZ, 2015), sorgo macerado (JIN; LIU; HE, 2011).

3.9. CONCLUSÃO

A construção de um bioprocesso que envolva toda a cadeia de produção, recuperação, purificação e aplicação requer a reunião de informações concisas sobre todo o assunto, que conferem ao pesquisador o material para seu estado da arte e execução eficiente das etapas do processo.

O processo de produção *on-site* tem estudos relativamente recentes, e é preciso ainda maior dedicação ao conhecimento das matérias-primas envolvidas, bem como dos insumos e micro-organismos. Porém, o desenvolvimento e aplicação desses processos pode levar a um novo conceito de biorrefinaria integrada, sustentável e eficiente.

4. ATUALIZAÇÃO E REVALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE GHOSE PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE CELULOLÍTICA

4.1. INTRODUÇÃO

As diversas aplicações do complexo celulolítico levam a uma elevada demanda na produção dessas enzimas. O complexo é composto por três tipos básicos de enzimas: (i) endoglucanases (EC 3.2.1.4), (ii) exoglucanases, como as celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e (iii) β -glucosidases (EC 3.2.1.21), que agem em sinergia para converter celulose em glicose (JUTURU; WU, 2014) e são expressas na natureza por micro-organismos, plantas e animais (ZHANG; ZHANG, 2013).

As endoglucanases são responsáveis por diminuir o grau de polimerização da celulose através de hidrólises randômicas ao longo da cadeia. As exoglucanases clivam os oligômeros gerados em dímeros e tetrâmeros que são hidrolisados pelas celobiasas a unidades de glicose. Esses complexos enzimáticos são geralmente produzidos, em escala industrial, por micro-organismos, sobretudo fungos e bactérias, sendo secretados no meio ou aderidos à parede celular do organismo (MOSIER et al., 1999; ZHANG; LYND, 2004; MAEDA et al., 2013; JUTURU; WU, 2014).

Cada organismo produz um complexo com diferentes características e, principalmente, com uma capacidade hidrolítica particular, sendo então necessário quantificar a atividade de cada uma das enzimas do complexo no sistema enzimático produzido. Essa quantificação, além de caracterizar o produto enzimático, permite determinar se é viável sua aplicação a determinada reação. Essa quantificação é feita, como determinado pela IUPAC, pelo método descrito por Ghose (1987).

A metodologia de Ghose permite determinar as atividades de endoglucanases, FPase e celobiasas, através dos métodos que utilizam carboximetilcelulose (CMCase), papel filtro (FPase) e celobiose como substratos, respectivamente. O método é eficiente e tem sido usado como padrão para quantificação de celulasas em todo o mundo. A detecção dos açúcares gerados nas reações enzimáticas é feita utilizando o reativo DNS, semelhante ao método descrito

por Miller (1959) em seu ensaio para a quantificação de açúcares. O reagente DNS, desenvolvido por Sumner e Somers (1944) tem como base o cromóforo ácido 3,5-dinitrossalicílico, que, em reação com açúcares é reduzido e muda sua coloração de amarelo para marrom-avermelhado, graças à formação do ácido 3-amino-5-nitrossalicílico (SUMNER; SOMERS, 1944).

Todavia, a execução do método da IUPAC para endocelulases e enzimas sacarificantes demanda um elevado volume final de amostra, que, após a leitura espectrofotométrica, se torna uma fonte de resíduo. O ácido 3,-5-dinitrossalicílico apresenta, além de riscos de manipulação, dano ao meio ambiente quando nele descartado, sendo de potencial risco a longo prazo para os ambientes aquáticos e seus organismos (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, 2009). Outro fator que acaba por elevar o volume final de resíduo é que os testes laboratoriais frequentemente são realizados para muitas amostras. Desse modo o volume final de resíduo é ambientalmente preocupante e já tem despertado a atenção de alguns pesquisadores que propuseram mudanças em algumas metodologias que utilizam DNS (NEGRULESCU et al., 2012; dos SANTOS et al., 2017).

Qualquer modificação em uma metodologia padrão deve ser posta à prova em um procedimento de validação, em que são testados diversos parâmetros a fim de verificar se a metodologia modificada apresenta resultados equivalentes aos obtidos com a metodologia original (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2012). São avaliados a reprodutibilidade do método, repetitividade, robustez, limites de detecção e quantificação, seletividade, intervalo, exatidão, precisão e linearidade (BRASIL, 2017). Se a modificação feita atende todos esses requisitos em relação à original, obtendo resultados equivalentes, é possível então utilizar a metodologia modificada em substituição à metodologia original. Entretanto, para a metodologia da IUPAC, não foram encontradas referências de revalidação da metodologia, pressupondo-se, então, que a utilização do método persiste em suas características originais, quando aplicado.

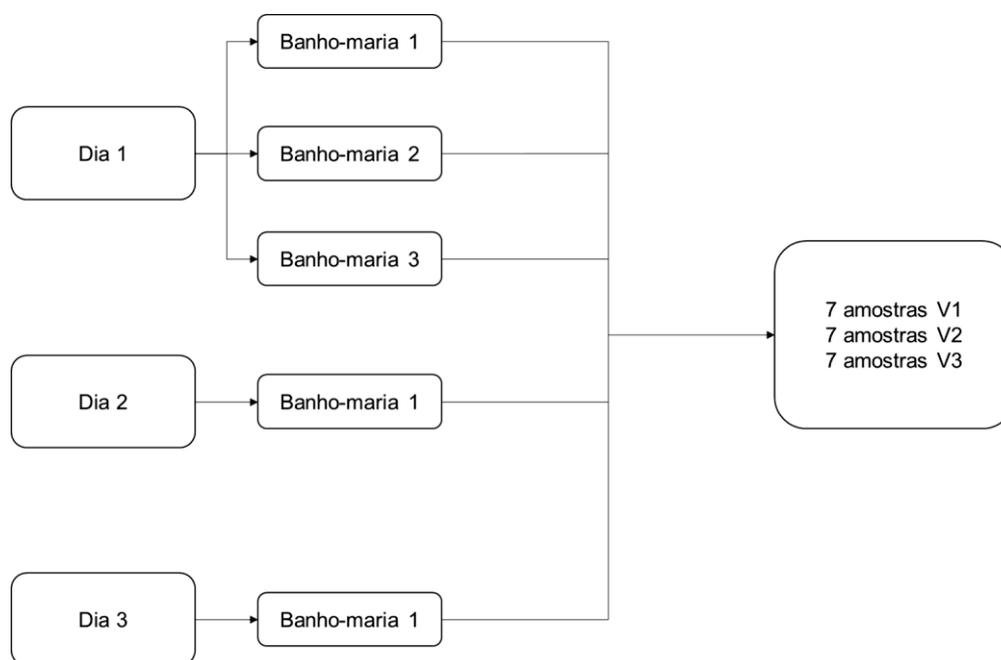
Levando em consideração a quantidade de reagentes utilizados e o preocupante volume de resíduo gerado na quantificação de atividade celulolítica descrita por Ghose, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia equivalente, reduzindo os volumes de enzima, substrato e reagente

cromóforo, respeitando e utilizando suas correlações estequiométricas.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Os testes foram realizados seguindo critérios determinados pela Anvisa (BRASIL, 2017) e pelo INMETRO (BRASIL, 2018). As metodologias para determinação de FPase e CMCase foram aplicadas em três volumes distintos: o original e dois reduzidos. Os ensaios foram realizados em condições de temperatura e tempo de reação pré-determinados na metodologia original e repetidos em três dias diferentes. Uma repetição adicional, utilizando três equipamentos (banhos-maria) diferentes foi feita. A FIGURA 4-1, a seguir, esquematiza o procedimento que foi realizado.

FIGURA 4-1 – ESQUEMA DOS TESTES REALIZADOS PARA VALIDAÇÃO DA MODIFICAÇÃO NA METODOLOGIA ORIGINAL



FONTE: A autora (2015)

4.2.1. Material

A enzima utilizada para os testes foi a CellicCtec2 da *Novozymes* e os substratos papel de filtro Whatman n°1 (JProlab) e carboximetilcelulose (sal sódico de média viscosidade: 400-1000 mPa.s) Sigma Aldrich. Todos os reagentes utilizados possuíam grau analítico.

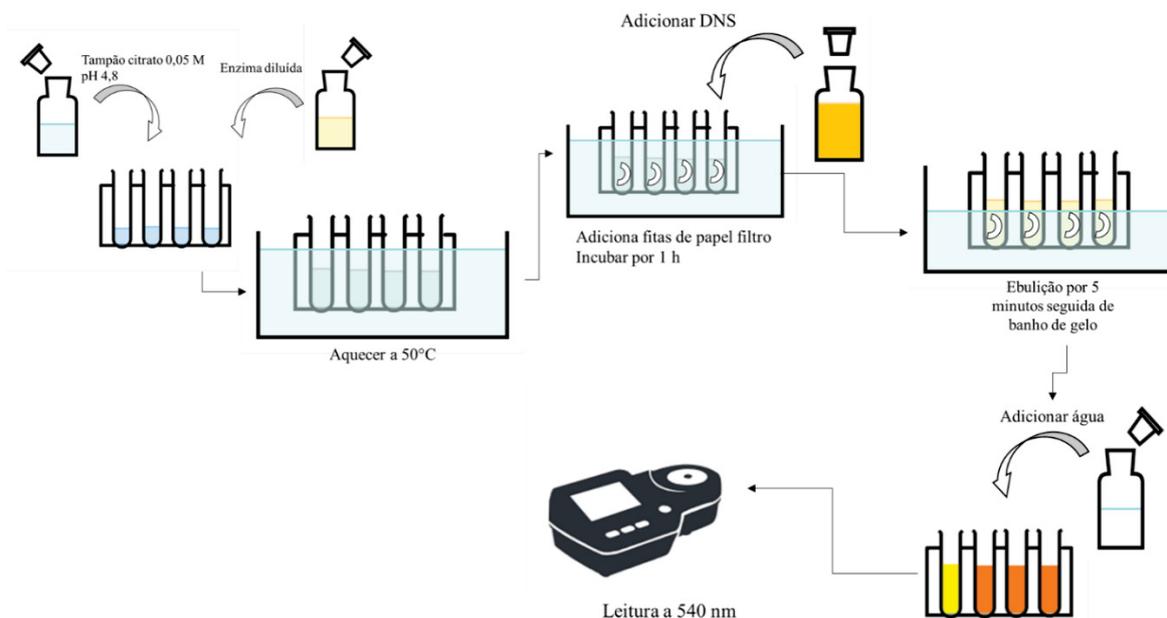
4.2.2. Teste do branco do substrato para o ensaio de FPase

A metodologia utilizada para quantificação das FPase não utiliza brancos do substrato, de modo que não avalia a potencial presença de interferentes no papel filtro que possam reagir com o ácido 3,5-dinitrossalicílico e acabar induzindo um falso positivo ou superestimação da atividade enzimática. Dessa forma, foi realizado um teste em triplicatas para identificação da possível influência do substrato na atividade. Como os experimentos foram conduzidos em três condições diferentes, foram avaliados os substratos nas três condições analisadas. Tal avaliação não foi feita para o procedimento de determinação das endoglucanases (CMCase) porque este já considera a influência do substrato utilizando-o previamente em todos os ensaios.

4.2.3. Atividade de FPase (FPase)

A metodologia de Ghose (1987) para FPase é feita como é descrito no seguinte fluxograma (FIGURA 4-2):

FIGURA 4-2 – FLUXOGRAMA DESCRITIVO DO PROCEDIMENTO DE ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FPASE PELO MÉTODO DE GHOSE



FONTE: A autora (2015)

Foi mantido o volume original do procedimento em um sistema (doravante denominado S₁) e outros dois foram elaborados para redução do volume (doravante denominados S₂ e S₃, respectivamente os sistema de volume intermediário e inferior) respeitando as proporções estequiométricas. Os volumes utilizados estão dispostos na TABELA 4-1:

TABELA 4-1– VOLUMES REACIONAIS APLICADOS NA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE ATIVIDADES DE FPASE (FPASE)

| | Ensaio | | |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|
| | S ₁ | S ₂ | S ₃ |
| Total (mL) | 24,5* | 5 | 2 |
| Tampão (µL) | 1000* | 204 | 82 |
| Enzima (µL) | 500* | 102 | 41 |
| Substrato (mg) | 50* | 10,2 | 4,1 |
| DNS (µL) | 3000* | 612 | 245 |
| Água (mL) | 20* | 4,1 | 1,63 |

FONTE: A autora (2015)

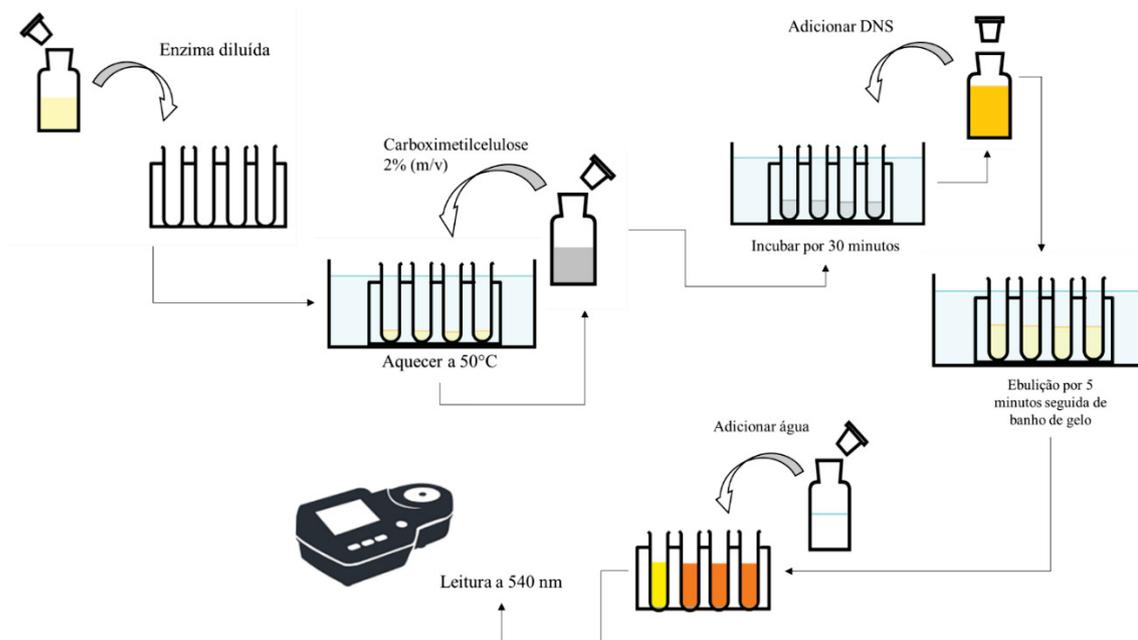
LEGENDA: *Volumes descritos no método original

A primeira coluna da TABELA 4-1 mostra os volumes ou massas aplicados no método original; as demais, os volumes ou massas adaptados para tubos pequenos (volume total de 5 mL) e microtubos de 2 mL. Após a reação executada nas três proporções foram obtidas as concentrações de açúcares liberados pela hidrólise enzimática que foram utilizadas como parâmetros de comparação entre os três sistemas e realização dos cálculos para validação.

4.2.4. Atividade de Endoglucanases (CMCase)

A metodologia de Ghose (1987) para CMCase é feita como descreve o seguinte fluxograma (FIGURA 4-3):

FIGURA 4-3 – FLUXOGRAMA DESCRITIVO DO PROCEDIMENTO DE ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DE CMCase PELO MÉTODO DE GHOSE



FONTE: A autora (2015).

Foi mantido o volume original do procedimento em um sistema e outros dois foram elaborados para redução do volume respeitando as proporções estequiométricas. Os volumes utilizados estão dispostos na TABELA 4-2:

TABELA 4-2 – VOLUMES REACIONAIS APLICADOS NA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE ATIVIDADES DE ENDOGLUCANASES (CMCASE)

| | Volumes | | |
|-----------------------|-----------------|----------------|----------------|
| | S ₁₁ | S ₂ | S ₃ |
| Total (mL) | 24* | 5 | 2 |
| Enzima (µL) | 500* | 104 | 42 |
| Substrato (µL) | 500* | 104 | 42 |
| DNS (µL) | 3000* | 625 | 250 |
| Água (mL) | 20* | 4,17 | 1,67 |

FONTE: A autora (2015)

LEGENDA: *Método original

Da mesma forma que no procedimento anterior, foi conduzido o experimento nas condições originais, como apresentado na segunda coluna da TABELA, e nas condições adaptadas, como descrito nas demais colunas. Após a reação executada nas três proporções foram obtidas as concentrações de açúcares liberadas pela hidrólise enzimática que foram utilizadas como parâmetros de comparação entre sistemas e realização dos cálculos para validação.

4.2.5. Padronizações

Alguns aspectos não definidos do procedimento foram padronizados para melhor execução, tais como o tempo de aquecimento prévio para alcance da energia de ativação da enzima, que foi fixado em 3 minutos. Além disso, o banho de gelo utilizado para a interrupção da reação dos açúcares com o DNS também teve seu tempo fixado em 5 minutos.

4.2.6. Procedimentos de validação

Os parâmetros de validação avaliados, a saber, linearidade, precisão (repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária), exatidão e limites de detecção e quantificação, são definidos pelo INMETRO (BRASIL, 2018).

4.2.6.1. Linearidade

A avaliação de linearidade tem como objetivo analisar se o método possui proporcionalidade à concentração do analito, dentro de uma faixa específica de trabalho, que compreende o intervalo entre sua menor e maior concentração (BRASIL, 2018). Foi feita a determinação da linearidade dos métodos ajustados e a consequente verificação de desvio desse parâmetro com a alteração das condições.

A avaliação se deu por meio de análise do R^2 das curvas-padrão nos volumes utilizados; a independência dos dados foi avaliada segundo o teste de Durbin-Watson (DURBIN; WATSON, 1951); teste F (Fisher, 1924) para a verificação de homocedasticidade; e os testes de Grubbs (GRUBBS, 1969) e Dixon (DIXON; MOOD, 1946) para avaliação da presença de *outliers* nas curvas-padrão.

O teste de Durbin-Watson é um teste de hipóteses que considera que os dados em uma regressão estão linearmente correlacionados entre si. A hipótese nula, então, determina que o coeficiente angular da equação característica dessa correlação é igual a zero, de modo que os valores dos resíduos das condições experimentais avaliadas são independentes. O resultado obtido no teste é comparado a dados tabelados na tabela de Durbin-Watson (d_u) e, quando o d calculado é maior que o d_u tabelado, admite-se que os dados obedecem à consideração da hipótese nula.

O teste de Grubbs é utilizado para identificar a presença de *outliers* (valores extremos) em grupos de amostras. Nessa abordagem, a hipótese nula considera que uma amostra possui resultado aberrante; e o valor Z calculado no teste é comparado a um Z crítico tabelado. Se o valor Z calculado for maior que o tabelado, rejeita-se a hipótese nula.

Da mesma forma, o teste de Dixon tem por objetivo determinar valores extremos num conjunto de dados. Todavia, em contraste ao anterior, não depende do valor do desvio-padrão e a hipótese é que os valores mais distantes são *outliers*. Assim como os demais, os resultados obtidos no cálculo estatístico são relacionados a um valor tabelado.

4.2.6.2. *Precisão e exatidão*

A definição de precisão foi estabelecida pela ISO - Vocabulário Internacional de Termos Gerais e Básicos de Metrologia como a proximidade entre valores obtidos em medidas de replicatas em condições específicas (ISO, 2004 *apud* ARAÚJO, 2009).

A precisão é determinada a partir de três parâmetros: a repetibilidade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade. A repetibilidade foi avaliada a partir de ensaios realizados no mesmo dia, utilizando os mesmos equipamentos e as mesmas condições – como preconizado pelo Inmetro - utilizando sete replicatas, como previamente descrito. Os dados foram avaliados através dos seus valores de HORRAT (*Horwitz ratio*) (HORWITZ, 1982) para determinar se havia repetibilidade, bem como o desvio-padrão relativo.

A precisão intermediária é avaliada a partir de uma variação de fatores tais como diferentes equipamentos em um período de diferentes dias (BRASIL, 2018). Neste trabalho foram feitos ensaios em dias diferentes, utilizando banhos-maria diferentes. Também os dados foram tratados para determinação do valor de HORRAT e desvio-padrão relativo. Os mesmos parâmetros permitiram a avaliação da reprodutibilidade dos testes.

No que concerne à exatidão, a análise foi feita a partir de observação de tendência, expressa pela recuperação analítica, tomando como valor de referência o conjunto de dados das determinações em comparação com os resultados com método oficial. Foram avaliados os valores de recuperação e veracidade/recuperação; ademais, também foram executados os testes t (STUDENT, 1908) e F (FISHER, 1924), para comparação das médias e das variâncias, respectivamente.

4.2.6.3. *Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)*

Os limites dos testes são as concentrações em que o analito ainda é determinado no método. No caso do limite de detecção (LD), avalia-se qual a

concentração em que o analito pode ser identificado, ainda que não quantificado, enquanto que o limite de quantificação (LQ) determina o ponto de menor concentração em que o analito possa ser identificado de modo a manter a precisão e a exatidão do método (BRASIL, 2018). Para o LQ foram feitos testes em sete replicatas nos menores pontos das curvas e foi avaliado pelo método descrito pelo Inmetro como “Branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito”, sendo a menor concentração aceitável aquela que seja detectável e mostre um valor de incerteza satisfatório. Para o LD, foi feita uma correlação entre o LD e o LQ, por meio da razão $LD = LQ/3,3$ (BRASIL, 2018).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes realizados permitiram avaliar os parâmetros desejados e foi possível validar as modificações nas metodologias, como demonstram os resultados a seguir.

4.3.1. Teste do branco do substrato para o ensaio de FPase

Foi possível detectar interferência do papel filtro na quantificação dos açúcares, uma vez que este, ao passar pelas etapas de aquecimento a 50°C por 1 hora e reação com DNS em ebulição por cinco minutos, foi parcialmente hidrolisado, apresentando concentração de açúcares de cerca de 0,5 mg/mL. Considerando que tal valor foi identificado como acima dos limites de detecção e quantificação (item 3.5) para o método, o ideal é que, ao ser realizado o procedimento de análise de atividade celulolítica utilizando de papel filtro, seja sempre realizado o teste de branco do substrato.

4.3.2. Experimentos de hidrólise enzimática para revalidação do método

Conforme a metodologia descrita, foram conduzidos os experimentos e foi

quantificada a concentração de açúcares liberada em cada uma das condições estudadas. Nas TABELAS 4-3 e 4-4 podem ser apreciados os resultados de atividade obtidos nas condições avaliadas para a determinação de FPase nos três volumes estudados:

TABELA 4-3– CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCAR OBTIDAS NO PRIMEIRO DIA, NOS TRÊS BANHOS, PARA OS TRÊS VOLUMES

| | | Dia 1 | | |
|------------------------|----------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| | | S₁* | S₂ | S₃ |
| Concentrações (g/L) | Banho 1 | 2,949 ± 0,097 | 2,711 ± 0,067 | 3,087 ± 0,148 |
| | Banho 2 | 2,82 ± 0,102 | 2,685 ± 0,105 | 2,932 ± 0,157 |
| | Banho 3 | 2,932 ± 0,180 | 2,739 ± 0,122 | 2,968 ± 0,184 |

FONTE: A autora (2015)

LEGENDA: *Método original

TABELA 4-4. ATIVIDADES NOS DIAS 2 E 3, REALIZADAS NUM MESMO EQUIPAMENTO

| | | Dia 2 | | |
|------------------------|--|-----------------------|----------------------|----------------------|
| | | S₁* | S₂ | S₃ |
| Concentrações (g/L) | | 2,896 ± 0,061 | 2,552 ± 0,116 | 2,831 ± 0,122 |
| | | Dia 3 | | |
| | | S₁* | S₂ | S₃ |
| Concentrações (g/L) | | 2,796 ± 0,140 | 2,897 ± 0,212 | 2,866 ± 0,089 |

FONTE: A autora (2015)

LEGENDA: *Método original

Nas TABELAS 4-5 e 4-6 podem ser apreciados os resultados das concentrações de açúcares obtidas nas condições avaliadas para a determinação de CMCase nos três volumes estudados:

TABELA 4-5 – CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCAR OBTIDAS NO PRIMEIRO DIA, NOS TRÊS BANHOS, PARA OS TRÊS VOLUMES

| | | Dia 1 | | |
|------------------------|---------|------------------|----------------|----------------|
| | | S ₁ * | S ₂ | S ₃ |
| Concentrações (g/L) | Banho 1 | 1,586 ± 0,078 | 1,558 ± 0,035 | 1,552 ± 0,104 |
| | Banho 2 | 1,533 ± 0,052 | 1,519 ± 0,067 | 1,548 ± 0,075 |
| | Banho 3 | 1,547 ± 0,094 | 1,505 ± 0,055 | 1,504 ± 0,057 |

FONTE: A autora (2015)

LEGENDA: *Método original

TABELA 4-6 – ATIVIDADES NOS DIAS 2 E 3, REALIZADAS NUM MESMO EQUIPAMENTO

| | | Dia 2 | | |
|------------------------|--|------------------|----------------|----------------|
| | | S ₁ * | S ₂ | S ₃ |
| Concentrações (g/L) | | 1,495 ± 0,036 | 1,498 ± 0,055 | 1,497 ± 0,073 |
| | | Dia 3 | | |
| | | S ₁ * | S ₂ | S ₃ |
| Concentrações (g/L) | | 1,563 ± 0,044 | 1,536 ± 0,031 | 1,588 ± 0,085 |

FONTE: A autora (2015)

LEGENDA: *Método original

Os resultados para os dois métodos mostram um padrão bastante consistente ante uma primeira vista das TABELAS 4.5 e 4.6. Contudo, para uma real análise da possibilidade de utilização dos métodos modificados, é preciso analisar os parâmetros de validação.

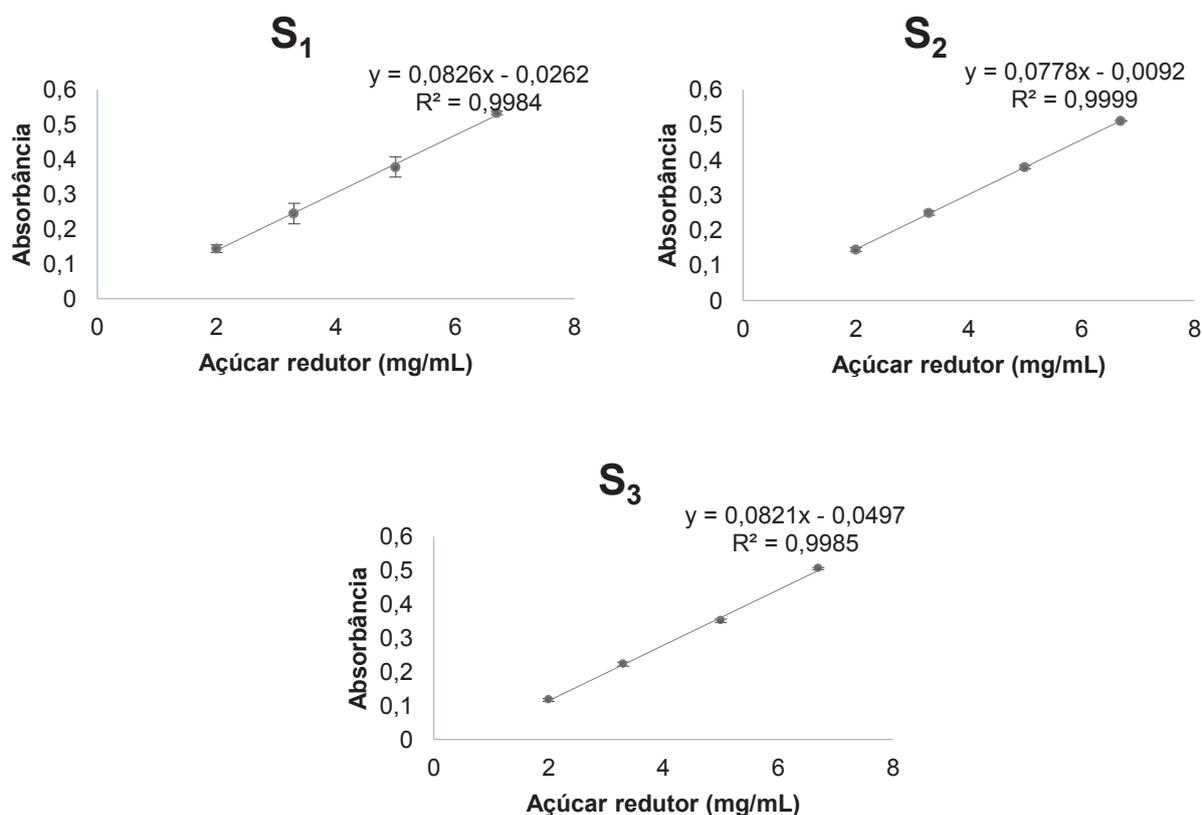
4.3.3. Linearidade

As curvas de calibração para os dois métodos foram construídas utilizando as concentrações de açúcares indicadas no método original, cada nível em três replicatas, como usualmente aplicado nos procedimentos cotidianos do laboratório.

4.3.3.1. FPase

Os testes de Grubbs e de Dixon indicaram a ausência de *outliers* nos dados das curvas, denotando a presença de valores consistentes, sem dados aberrantes. Os dados das curvas, bem como seu R^2 , podem ser vistos na FIGURA 4-4, em que estão dispostas as curvas de calibração nos três volumes para a determinação de atividade de FPase.

FIGURA 4-4–CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA AS TRÊS CONDIÇÕES DE VOLUME REACIONAL TESTADOS NA QUANTIFICAÇÃO DE FPASE



FONTE: A autora (2016)

É possível verificar que, nos três sistemas de análise, as curvas-padrão obtidas mantêm-se lineares nas concentrações utilizadas, todas com R^2 maior que 0,998, estando dentro do padrão exigido por todos os órgãos de regulamentação de validação de experimentos analíticos. Foi identificado também que a distribuição dos

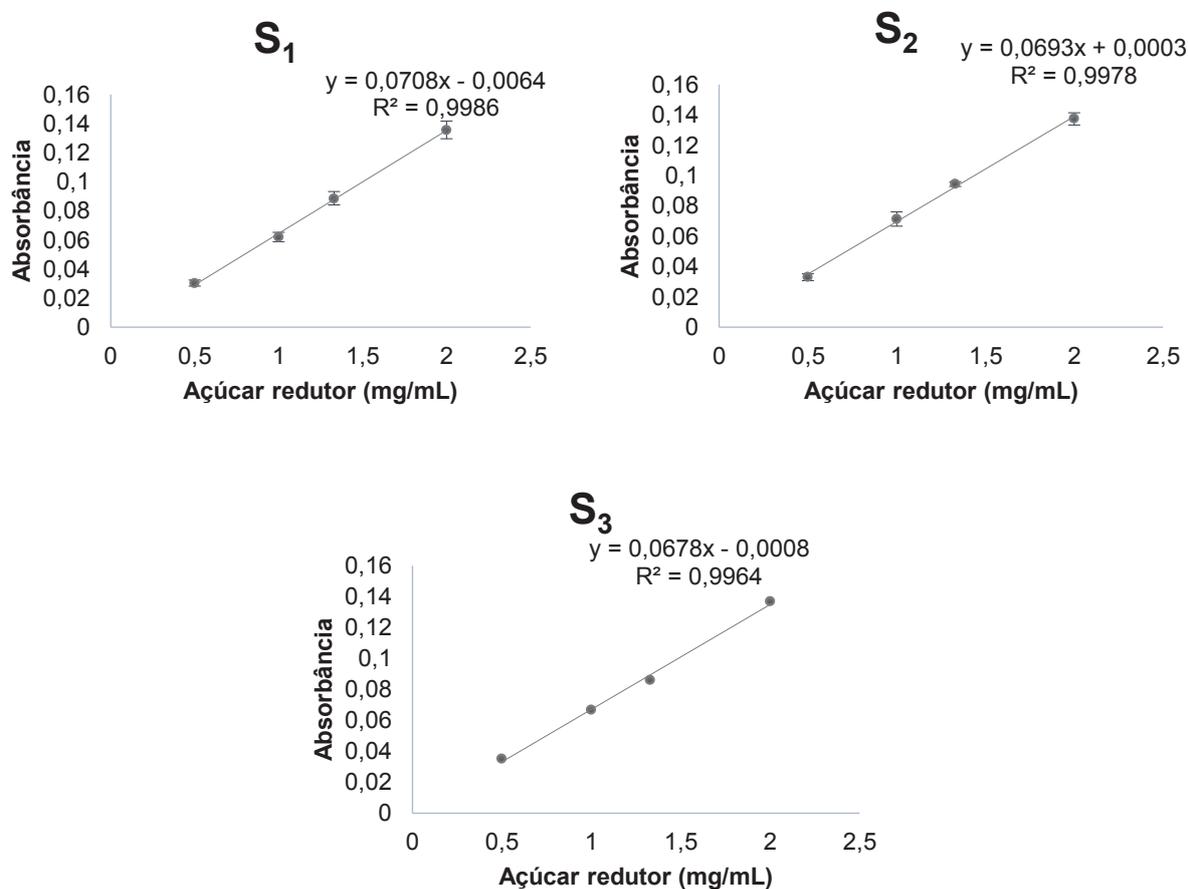
resíduos é aleatória, indicando que os dados são homocedásticos, sendo que esta última característica também foi avaliada através de um teste F, que levou à mesma constatação.

O teste de Durbin-Watson permitiu concluir que os dados são independentes, com $d = 2,28 > d_u = 1,36$ para S_2 e $d = 2,84 > d_u = 1,36$ para S_3 (sendo d o fator do teste utilizado e d_u o valor de d tabelado para as condições aplicadas). Como d é superior a d_u , os dados são considerados independentes. A independência e a homocedasticidade se unem ao R^2 para mostrar que a linearidade dos métodos estão conforme, de acordo com todos os parâmetros requisitados pelo INMETRO. Os resultados então garantem que a absorvância detectada é diretamente proporcional à concentração de analito nas amostras.

4.3.3.2. *CMCase*

Quanto ao método de endoglucanase, os testes de Grubbs e de Dixon (teste Q) também indicaram a ausência de *outliers* nos dados das curvas, denotando a presença de valores consistentes, sem dados destoantes. Os dados das curvas, bem como seu R^2 , podem ser vistos na FIGURA 4-5, em que estão dispostas as curvas de calibração nos três volumes para a determinação de atividade de endoglucanase.

FIGURA 4-5–CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA AS TRÊS CONDIÇÕES DE VOLUME REACIONAL TESTADOS NA QUANTIFICAÇÃO DE ENDOGLUCANASES (CMCASE)



FONTE: A autora (2016)

É possível verificar que, nos três sistemas de análise, as curvas-padrão mantêm-se lineares nas concentrações utilizadas, todas com R^2 maior que 0,996, estando dentro do padrão exigido por todos os órgãos de regulamentação de validação de experimentos analíticos. Foi identificada a aleatoriedade da distribuição dos resíduos e homocedasticidade dos dados, avaliada também através de um teste F, que levou à mesma conclusão.

O teste de Durbin-Watson mostrou a independência dos dados, com $d = 2,82 > d_u = 1,36$ para S₃ e $d = 2,2 > d_u = 1,36$ para S₂. A independência e a homocedasticidade se unem ao R^2 para mostrar que a linearidade dos métodos

estão conforme, de acordo com todos os parâmetros requisitados pelo INMETRO (BRASIL, 2018).

Coeficientes semelhantes ao deste estudo foram encontrados por Santos e colaboradores (2017) ao reduzir a quantificação de açúcares pelo método de DNS para o nível de microplacas, realizando todo o procedimento de validação para frutose e glicose como analitos. Negrulescu e colaboradores (2012) também reduziram o método de DNS ao nível de microplacas, mas utilizando aquecimento em micro-ondas para a reação; os autores afirmam que as curvas-padrão se apresentaram lineares para 95% de confiança. A mesma alegação é feita por Gonçalves e colaboradores (2010), que também reduziram os volumes de reagentes utilizados no método de DNS em microplacas.

4.3.4. Precisão e exatidão

4.3.4.1. *FPase*

Mais uma vez não foi identificada a presença de *outliers*. A avaliação da repetibilidade verificou desvios-padrão relativos de 3,10% para o método de S_3 e 4,47% para S_2 . Os valores de HORRAT, de 0,64 e 0,92, são considerados satisfatórios, uma vez que é desejado que estejam abaixo de 1.

No que concerne à precisão intermediária, os valores de desvio-padrão relativo obtidos foram de 1,81 e 1,24% para S_3 e S_2 , respectivamente; da mesma forma, os valores de HORRAT foram 0,38 e 0,25, ambos inferiores a 1. No caso da precisão intermediária, é desejável que estes valores sejam inferiores a 2. A reprodutibilidade também se mostrou dentro do conforme, com valores de desvio-padrão relativo abaixo de 6%.

A avaliação da exatidão foi feita a partir da avaliação de tendência, como designado pelo INMETRO, utilizando como valores de referência os conjuntos de dados do método oficial. Para S_3 foi obtida recuperação de 102% e, para S_2 , 95,8%, ambos dentro do intervalo considerado ideal (entre 95 e 105%). Também foi executada a verificação da exatidão pela determinação dos valores t e F , que se

mostraram inferiores ao $t_{\text{crítico}}$ e ao $F_{\text{crítico}}$, o que indica que não há diferença significativa entre os valores obtidos, de modo que o método é exato (BRASIL, 2018).

4.3.4.2. *Endoglucanase*

Também não foi identificada a presença de *outliers* para precisão e exatidão no método de endoglucanase. A avaliação da repetibilidade verificou desvios-padrão relativos de 2,67% para S_3 e 2% para S_2 . Os valores de HORRAT, de 0,48 e 0,28, são considerados satisfatórios, uma vez que é desejado que estejam abaixo de 1 para o parâmetro de repetibilidade.

Em relação à precisão intermediária, os valores de desvio-padrão relativo obtidos foram de 1,96 e 1% para os métodos S_3 e S_2 , respectivamente; da mesma forma, os valores de HORRAT foram 0,37 e 0,21; ambos inferiores a 2, como requerido para o parâmetro de precisão intermediária. A reprodutibilidade também se mostrou dentro do conforme, com valores de desvio-padrão relativo abaixo de 6%.

A avaliação da exatidão foi feita a partir da avaliação de tendência, como designado pelo INMETRO, utilizando como valores de referência os conjuntos de dados do método oficial. Para o S_3 foi obtida recuperação de 99,6% e, para o S_2 mL, 98,6%, ambos dentro do intervalo considerado ideal (>95% e <105%). Também foi verificada a exatidão pela determinação dos valores t e F , que se mostraram inferiores ao $t_{\text{crítico}}$ e ao $F_{\text{crítico}}$, indicando que o método é exato (BRASIL, 2018).

Negulescu e colaboradores (2012), analisando o método de DNS para quantificação de açúcares em microplacas, obtiveram paralelos aos valores de HORRAT semelhantes ao deste estudo e desvios-padrão relativos de 5,4%, apresentando variabilidade superiores àquelas encontradas neste estudo, entretanto ainda assim o método foi considerado preciso.

4.3.5. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

4.3.5.1. *FPase*

Os testes para os limites de detecção permitiram fazer mais um ajuste no método original, uma vez que foi possível ainda detectar presença de açúcares em menores concentrações do que aquelas designadas como menor ponto da curva na descrição da metodologia. Foi observado, então, que os açúcares seriam detectáveis com graus aceitáveis de precisão a partir de 0,5 mg/mL. Esse valor foi utilizado como ponto mais baixo da curva, sendo aplicado nos cálculos das zonas limítrofes para detecção e quantificação.

Para S₃, feito em microtubos, se descobriu ser necessária uma concentração de 0,27 mg/mL de açúcares para quantificação. O LD foi então de 0,08 mg/mL. Já para a análise de S₂, o LQ foi de 0,08 mg/mL e para detecção, uma concentração de 0,02 mg/mL, pelo menos, seria necessária. Essa diferença se dá, provavelmente, pelo fato de que um volume menor de componentes pode ser mais susceptível a erros, de modo que uma concentração mais alta de açúcares geraria dados mais consistentes e com precisão aceitável para análise.

4.3.6. *Endoglucanase*

No que concerne à avaliação da atividade de endoglucanase, foi avaliado o ponto mínimo da curva (0,5 mg/mL) e pontos abaixo dele. Foram obtidos resultados com precisão aceitável a partir de 0,5 mg/mL. Esse valor foi então aplicado nos cálculos das zonas limítrofes para detecção e quantificação.

Para S₃, feito em microtubos, se mostrou necessária uma concentração de 0,34 mg/mL de açúcares para quantificação. O LD foi então de 0,10 mg/mL. Já para a análise de S₂, o LQ foi de 0,09 mg/mL e para detecção, uma concentração de 0,03 mg/mL seria o mínimo necessário. Nesses dados nota-se uma semelhança quanto ao que foi obtido no método de *FPase*, o que sustenta a hipótese inicial de que menores volumes requerem uma maior concentração para obtenção de dados mais

consistentes e precisos. Naturalmente, esse detalhe não tira o mérito de que há uma considerável redução na quantidade de reagente utilizado e de consequente resíduo gerado.

Os limites de detecção e quantificação são semelhantes, embora ligeiramente menores, que os encontrados por Santos e colaboradores (2017), que quantificaram açúcares redutores a partir do método de DNS, que foram LD de 0,039 mg/mL para glicose e 0,0741 mg/mL para frutose e LQ de 0,13 mg/mL para glicose e 0,247 mg/mL para frutose. Paralelamente, Gonçalves e colaboradores obtiveram valores muito similares aos encontrados neste estudo para os dois métodos, com LD de 0,11 mg/mL e LQ de 0,34 mg/mL.

4.3.6. Discussão

Estatisticamente, os resultados alcançados mostraram-se dentro dos padrões exigidos e satisfatórios no que concerne à aplicação dos métodos adaptados para análise de rotina. A utilização dos métodos ajustados permite reduzir a utilização de reagentes em até cerca de 12 vezes, o que representa uma economia em termos de reagentes e água, que tanto é usada na execução do procedimento quanto no preparo dos reativos e soluções. Uma vez que é utilizada a água deionizada ou destilada, também há uma redução na energia aplicada nos processos de destilação e purificação da água, bem como o menor uso dos filtros utilizados nesses processos, aumentando sua vida útil.

Ao lado desses benefícios, reduz-se o lançamento de resíduos de DNS na mesma proporção, de modo que, para análises em grande quantidade de amostra, como normalmente ocorre em laboratórios de pesquisa e controle de qualidade, é consideravelmente reduzido o volume de resíduo a ser tratado e descartado.

Camassola e Dillon (2012) fizeram alterações semelhantes em método de quantificação de FPase descrito por Mandels, Andreotti e Roche (1976) e posteriormente ajustado por Eveleigh e colaboradores (2009). Assim como no presente estudo, os autores reduziram a quantidade total de material utilizado e resíduo descartado e garantem a reprodutibilidade do método, contudo, os autores

não mostram no estudo se executaram os demais parâmetros de validação. Deve-se lembrar que a revalidação de um método já consolidado é essencial para que haja confiabilidade na metodologia modificada (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2012).

Vale salientar que dentre os autores comparados, nenhum deles apresentou ajuste no método da IUPAC para análise de atividade celulolítica; apenas fizeram ajustes em outras metodologias de análise de celulase e quantificação de açúcares utilizando DNS. Outro fator que também deve ser destacado é que, a redução para o volume de microplacas, como mostrado nos trabalhos da literatura, não seria viável no presente caso devido às condições de reação, uma vez que as misturas reacionais são de difícil homogeneização. A mistura em tubos pode ser homogeneizada em agitadores de tubos tipo vórtex, o que não é possível nas microplacas. No caso do papel de filtro, ainda seria necessário definir um pedaço muito pequeno da fita de papel, o que apresentaria dificuldades na padronização e pesagem, além de que, se fosse realizada a leitura espectrofotométrica diretamente, a fita de papel desviaria o fecho de luz.

4.4. CONCLUSÃO

Com os testes realizados foi possível obter resultados satisfatórios e dentro dos padrões requeridos para os experimentos de validação de métodos. Dessa forma, é possível aplicar as variações na metodologia sem prejudicar os resultados e ainda reduzir custos e riscos ao meio ambiente e à saúde do manipulador, com menor uso de reagentes e menor geração de resíduos.

Levando em consideração o interesse significativo em pesquisas utilizando celulases, é essencial que sejam feitos ajustes nos métodos originais, de modo a reduzir custos e resíduos, aproveitando os recursos dos quais se dispõe atualmente e que, porventura, não estavam disponíveis à época em que foi desenvolvido o método. Também é primordial que as alterações nos métodos sejam validadas dentro dos parâmetros aplicados pelos órgãos competentes, assim como foi realizado no presente estudo.

5. PRODUÇÃO *on site* DE COMPLEXO (HEMI)CELULOLÍTICO UTILIZANDO CACHOS DE FRUTOS VAZIOS DE PALMA COMO SUBSTRATO

5.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de bioprocessos para produção de enzimas celulolíticas de baixo custo é objeto frequente de estudo, sobretudo no que concerne à indústria de biocombustíveis. Esse destaque se deve ao uso de tais catalisadores na cadeia produtiva do etanol de segunda geração, na qual são aplicados para hidrólise da celulose a açúcares fermentescíveis, que serão fermentados a etanol. Essa busca faz com que haja uma expectativa de aumento na participação das celulasas no mercado mundial de enzimas, que já é de 20% (YU; LI, 2015; SRIVASTAVA et al., 2017). Apesar do enfoque atual na produção de celulasas voltadas aos biocombustíveis, elas também são aplicáveis nas indústrias de alimentos, ração animal, detergentes, tecidos, polpa e papel e tratamento de resíduos para reciclagem (PATHAK; BHARDWAJ; SINGH, 2014; YOON et al., 2014).

As celulasas são indispensáveis no processo de produção do etanol de segunda geração. Entretanto, são ainda um gargalo econômico (SRIVASTAVA et al., 2017), uma vez que sua aplicação é a segunda etapa mais cara do processo, sendo superada apenas pelos pré-tratamentos químicos (MOOD et al., 2013; WATANABE, 2013; BEHERA et al., 2014). A investigação exaustiva para ajustes no processo de produção, engenharia de micro-organismos e utilização de matéria-prima de baixo custo visam atenuar o impacto do custo do complexo enzimático sobre o preço final do produto, uma vez que o etanol é um produto de baixo valor final agregado.

Paralelamente à produção das celulasas, a maioria dos micro-organismos produzem também enzimas hemicelulolíticas, tais como as xilanases e mananases, responsáveis pela degradação dos polímeros de xilana e manana, componentes da maioria das hemiceluloses presentes na parede celular dos vegetais, em conjunto com a celulose e a lignina. (DHILON et al., 2011; ANG et al., 2013; THOMAS; PARAMESWARAN; PANDEY, 2016; CUNHA; BADINO; FARIAS, 2017). Um consórcio enzimático capaz de hidrolisar os componentes das estruturas holocelulósicas é de grande interesse para a formação de açúcares fermentescíveis,

uma vez que existem micro-organismos capazes de converter hexoses e pentoses a etanol.

A produção de enzimas é estudada em diversas condições de processo, sob fermentações submersa, sólida ou semissólida. Líderes mundiais na produção dessas enzimas, tais como a *Novozymes*TM, utilizam fermentação submersa em seu processo (HANSEN et al., 2015). Fermentação em estado sólido possui a vantagem de, geralmente, levar a maiores concentrações do bioproduto desejado (YOON et al., 2014; HANSEN et al., 2015). Entretanto, os pontos de controle do processo são mais escassos; características importantes para a fermentação, tais como oxigênio dissolvido, pH e temperatura, não podem ser monitoradas e/ou alteradas durante seu andamento. As fermentações semissólidas (submersas com sólidos suspensos) podem ser bem aplicadas para a produção de celulases a partir de material lignocelulósico, uma vez que a celulose é um polímero insolúvel (WILSON, 2011).

Usualmente, as fermentações para produção de celulases e hemicelulases são realizadas por fungos filamentosos dos gêneros *Trichoderma* (RAGHUWANSHI et al., 2014; DELABONA et al., 2016; LI et al., 2016; LIBARDI et al., 2017). e *Aspergillus* (CUNHA et al., 2012; NARRA et al., 2012; SAJITH et al., 2014; SHARMA R. et al., 2015; CUNHA; BADINO; FARIAS, 2017), mas também outros fungos e bactérias de diferentes espécies são estudados para este fim. (JUTURU; WU, 2012; JUTURU; WU, 2014).

Diversos substratos lignocelulósicos já foram utilizados na produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, tais como palha de milho (ZHAO et al., 2018), bagaço de cana-de-açúcar (MARQUES et al., 2018), casca de café (MARÍN; ARTOLA; SÁNCHEZ, 2018), farelo de trigo (HEMANSI et al., 2018), cachos vazios de palma (AJIJOLAKEWU et al., 2017), cascas e farelo de arroz, espigas de milho, farelo de trigo (BAGEWADI et al., 2017), dentre outros. O Brasil, como país de base agroindustrial, gera uma grande quantidade de resíduos lignocelulósicos no beneficiamento e processamento de produtos oriundos de biomassa vegetal. Uma das indústrias em expansão com potencial para reaproveitamento desses resíduos é a de produção de óleo de palma. Os cachos vazios dos frutos, resíduos oriundos do processo de debulhagem, compreendem uma matéria-prima lignocelulósica promissora para diversos fins. Dessa forma, vê-se a possibilidade de aplicação

desse resíduo como substrato para a produção de enzimas (hemi)celulolíticas a partir de fungos filamentosos.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a produção de enzimas (hemi)celulolíticas por fungos filamentosos cultivados em biomassa residual da indústria do óleo de palma, bem como selecionar aqueles com mais afinidade com as características do bioprocessamento, além de realizar a otimização do meio fermentativo para sua produção, com potencial de aplicação em bioconversão de matéria lignocelulósica.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

O resíduo lignocelulósico utilizado, consistindo em cachos vazios dos frutos de palma (EFB – do inglês *empty fruit bunches*) (cadastro sisgen A2BC737) oriundos da produção do óleo de palma, foi fornecido pela Biopalma da Amazônia, divisão da VALE S.A., responsável pelo cultivo da palma oleaginosa e produção de óleo de palma.

5.2.1. Caracterização do resíduo

O resíduo dos cachos vazios dos frutos de palma (EFB) foi seco em estufa a 60°C, moído em moinho de facas e separado em tamizador de acordo com sua granulometria. Nas fermentações desenvolvidas, foi utilizada toda a fração que estivesse com granulometria menor que 0,35 mm. Foi realizada uma caracterização estrutural, utilizando para tal a metodologia da NREL – NREL/TP-510-42618 (SLUITER et al., 2008) que permite determinar os teores de lignina, celulose e hemicelulose da biomassa vegetal, assim como cinzas e extraíveis.

A extração dos componentes em álcool, éter e água foi realizada em equipamento Soxhlet com tempo total de cada procedimento de 8 horas. A umidade foi quantificada por gravimetria, bem como as cinzas e fração insolúvel da lignina. A lignina solúvel foi calculada a partir de leituras espectrofotométricas (240-280 nm). Os açúcares estruturais e o ácido acético (para determinação dos grupos acetato)

foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta resolução (fase móvel H₂SO₄ 5 mM, 0,6 mL/min; coluna a 60°C, detector de índice de refração).

Para avaliação da composição de íons disponíveis no meio para o desenvolvimento do micro-organismo, foi analisada a composição em íons solúveis após a autoclavagem do meio (120°C por 15 minutos). A análise foi feita em cromatógrafo de íons Metrohm, utilizando as seguintes condições: para cátions – coluna METROSEP C3, com HNO₃ 3,5 mM como fase móvel, fluxo de 0,9 mL/min de amostra, a 40°C por 25 minutos; para ânions – coluna METROSEP A Sup5, com Na₂CO₃ 3,2 mM e NaHCO₃ 1,0 mM como fase móvel, fluxo de 0,7 mL/min de amostra, a temperatura ambiente, por 30 minutos (METROHM, 2018).

5.2.2. Seleção de linhagens produtoras de enzimas (hemi)celulolíticas

A seleção teve como objetivo avaliar a capacidade de cada cepa em produzir celulasas, xilanase e mananase utilizando *empty fruit bunches* (EFB) moído como substrato em fermentação semissólida. Inicialmente, foi verificada a atividade das enzimas produzidas e, em seguida, a capacidade de cada extrato enzimático de hidrolisar a palma pré-tratada a unidades de glicose.

5.2.3. Micro-organismos

Para a produção das enzimas, foram testadas sete cepas de micro-organismos dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Colletotrichum* do banco de cepas do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, descritas na TABELA 5-1.

TABELA 5-1 – LINHAGENS DE FUNGOS FILAMENTOSOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS (HEMI)CELULOLÍTICAS UTILIZANDO OS CACHOS VAZIOS DOS FRUTOS DE PALMA COMO SUBSTRATO

| Linagem | Origem |
|---|--|
| <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326 | banco internacional de cepas NRRL |
| <i>Aspergillus niger</i> NRRL 328 | banco internacional de cepas NRRL |
| <i>Aspergillus</i> sp. | isolado dos cachos vazios dos frutos de palma por pesquisadores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná |
| <i>Trichoderma harzianum</i> TRIC03 | isolados de seringueira por pesquisadores da Universidade Estadual de Feira de Santana |
| <i>Trichoderma</i> sp. TRIC05 | isolados de seringueira por pesquisadores da Universidade Estadual de Feira de Santana |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> TRIC04 | isolados de seringueira por pesquisadores da Universidade Estadual de Feira de Santana |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f.sp. <i>aeschynomenes</i> TRIC02 | isolados de seringueira por pesquisadores da Universidade Estadual de Feira de Santana |

FONTE: A autora (2017)

A manutenção das linhagens e inóculo foram preparados em meio PDA (*potato dextrose agar* – ágar de batata e dextrose), em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, com 50 mL de meio. Os micro-organismos foram inoculados por técnica de semeadura em profundidade e o cultivo mantido a 30°C para crescimento e esporulação entre cinco e sete dias.

5.2.4. Produção de enzimas por fermentação submersa com sólidos suspensos

Para produção das enzimas, foi realizada uma fermentação submersa com sólidos, no qual a fonte de carbono foi o resíduo dos cachos vazios da palma moído (EFB), com granulometria menor que 0,35 mm, o qual foi suspenso em solução de micronutrientes (TABELA 5-2) descrita por Mandels e Weber (1969) e Neoh et al.

(2015). O cultivo, com taxa inoculação de 10^7 esporos/mL, foi feito em frascos de Erlenmeyer de 250 mL e mantido em agitador orbital a 30°C e 120 rpm por 7 dias. Após o período de cultivo fermentação, foi separada a fração sólida, composta de biomassa vegetal e microbiana, e o sobrenadante contendo as enzimas de interesse.

TABELA 5-2 – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS UTILIZADOS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DAS CELULASÉS

| Meio 1 (Mandels;Weber, 1969) | | Meio 2 (Neoh et al., 2015) | |
|---|------------|---|------------|
| Nutriente | Composição | Nutriente | Composição |
| KH₂PO₄ | 2 g/L | KH₂PO₄ | 0,1% |
| (NH₄)₂PO₄ | 1,4 g/L | Extrato de levedura | 0,5% |
| Ureia | 0,3 g/L | NaCl | 0,05% |
| MgSO₄ 7H₂O | 0,3 g/L | MgSO₄ 7H₂O | 0,05% |
| CaCl₂ | 0,3 g/L | Fonte de carbono (EFB) | 2% (m/v) |
| FeSO₄ 7H₂O | 5,0 mg/L | | |
| MnSO₄ H₂O | 1,56 mg/L | | |
| ZnSO₄ 7H₂O | 1,4 mg/L | | |
| CoCl₂ | 2,0 mg/L | | |
| Fonte de carbono (EFB) | 1% (m/v) | | |

FONTE: A autora (2016)

LEGENDA: Todos os sais utilizados estavam na forma anidra, a menos que especificado seu teor de água.

Quando as condições assim exigiam, meios com diferentes concentrações dos referidos componentes foram utilizados. Todas as mudanças nas condições estão descritas na metodologia que segue.

5.2.5. Atividade de FPase (FPase)

Para determinação da atividade de celulase com ação sobre o papel de filtro, foi utilizada metodologia descrita por Ghose (1987) modificada (SIQUEIRA et al., 2020b), em que 41 μL de extrato enzimático foram adicionados a 82 μL de tampão citrato 0,05 M pH 4,8. A mistura foi agitada e aquecida a 50°C. Foi adicionada, então, uma fita de papel de filtro Whatman nº1 de 4,1 mg (0,5 cm x 1 cm). O sistema foi incubado a 50°C por 1 h. Após o tempo de reação, foi acrescentado 245 μL do reativo de DNS e a mistura submetida a banho em ebulição por 5 minutos para quantificação dos açúcares redutores. A reação foi interrompida em banho de gelo também por 5 minutos. Foi adicionado 1,63 mL de água e feita a leitura a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima (em volume) necessária para liberação de 1 μmol de açúcares redutores (expressos em glicose) por mL de reação por minuto.

5.2.6. Atividade de endoglucanase (CMCase)

Para determinação da atividade de endoglucanase, foi utilizada metodologia descrita por Ghose (1987) modificada (SIQUEIRA et al., 2020b), em que 42 μL de extrato enzimático foram adicionados a 42 μL de CMC 2% (m/v) em tampão citrato 0,05 M pH 4,8. O sistema foi incubado a 50°C por 30 minutos. A quantificação dos açúcares redutores foi feita reagindo a mistura hidrolisada com 250 μL de reativo de DNS em banho em ebulição por 5 minutos. A reação foi interrompida em banho de gelo também por 5 minutos. Foi adicionado 1,67 mL de água e feita a leitura a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima (em volume) necessária para liberação de 1 μmol de açúcares redutores (expressos em glicose) por mL de reação por minuto.

5.2.7. Atividade de xilanase

Para determinação da atividade de xilanase, foi utilizada metodologia

descrita por Bailey, Biely e Poutanen (1992) modificada, em que 20 μ L de extrato enzimático foram adicionados a 180 μ L de xilana beechwood 1% (m/v) em tampão citrato 0,05 M pH 5,3. A mistura foi incubada em banho-maria a 50°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 300 μ L do reativo de DNS e a mistura levada a banho em ebulição por 5 minutos para quantificação dos açúcares redutores. A reação foi interrompida em banho de gelo também por 5 minutos. Foi feita a leitura a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima (em volume) necessária para liberação de 1 μ mol de açúcares redutores (expressos em xilose) por mL de reação por minuto.

5.2.8. Atividade de mananase

Para determinação da atividade de mananase, foi utilizada metodologia descrita por Rättö e Poutanen (1988). Assim sendo, 500 μ L de extrato enzimático foram adicionados a 500 μ L de *locust bean gum* (LBG) em tampão citrato 0,05 M pH 5,3. A quantificação dos açúcares redutores foi feita reagindo a mistura hidrolisada com 1 mL de reativo de DNS em banho em ebulição por 5 minutos. A reação foi interrompida em banho de gelo também por 5 minutos. Adicionou-se 5 mL de água deionizada e feita a leitura a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima (em volume) necessária para liberação de 1 μ mol de açúcares redutores (expressos em manose) por mL de reação por minuto.

5.2.9. Hidrólise enzimática do resíduo pré-tratado

Foram realizados testes para avaliar a capacidade dos extratos enzimáticos produzidos hidrolisarem o resíduo de cachos vazios de palma pré-tratado (NaOH 5% 120°C/60 minutos) e verificar seu potencial para produção de glicose. A hidrólise foi feita em banho-maria com agitação a 100 rpm e 50°C. O resíduo foi mantido em suspensão no extrato bruto em proporção de 14% (m/v) (condição determinada em testes anteriores). Após hidrólise durante 72 horas, a suspensão foi mantida em banho em ebulição por 5 minutos para inativar a enzima, seguido de banho de gelo

também por 5 minutos. Então, a mistura foi centrifugada a 4500 rpm por 20 minutos e o sobrenadante separado foi analisado para presença de açúcares. A análise foi executada via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em coluna HiPlex (fase móvel H₂SO₄ 5 mM, 0,6 mL/min; coluna a 60°C, detector de índice de refração).

5.2.10. Teste de viabilidade celular do micro-organismo

A utilização do micro-organismo na cultivo para produção de enzimas na forma de inoculação de esporos requer que este possua células viáveis no meio de inoculação. Para tal foi feito um teste de viabilidade celular, em que a cepa foi inoculada em meio PDA (50 mL) em frascos de Erlenmeyer de 125 mL e incubados em estufa a 30°C durante 8 dias. A cada dia, dois frascos eram retirados para análise da viabilidade. A análise consistiu em suspender células e esporos em solução de Tween 80 a 0,5% (v/v), e realizar contagem em Câmara de Neubauer. Diluições sucessivas foram feitas até que a contagem estivesse entre 30 e 300 esporos. Da diluição com essa quantidade de esporos eram retirados 100 µl, que eram levados a uma placa de Petri com meio PDA e espalhados com alça de Drigalski. A cada dia eram avaliadas as placas para verificação da formação de unidades formadoras de colônia. A relação entre unidades formadoras de colônia e esporos contados na diluição determina a viabilidade celular do micro-organismo no dia avaliado.

5.2.11. Seleção dos componentes minerais do meio de produção de enzimas (hemi)celulolíticas

Levando em consideração a importância da presença de micronutrientes no crescimento do micro-organismo, bem como na produção de enzimas, decidiu-se analisar a influência da composição mineral do meio Mandels e Weber (1969) na produção das (hemi)celulases de interesse. Para tal, foram feitos cultivos cuja composição variou de acordo com as condições de um planejamento fatorial de Plackett e Burman (PLACKETT; BURMAN, 1946) com n = 7 e 8 experimentos. Os

níveis aplicados estão descritos na TABELA 5-3. As respostas para o planejamento foram as atividades enzimáticas como acima descritas.

TABELA 5-3. NÍVEIS DAS VARIÁVEIS AVALIADAS NO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN

| Nível | KH ₂ PO ₄ (g/L) | MgSO ₄ .2H ₂ O (g/L) | CaCl ₂ (g/L) | FeSO ₄ .7H ₂ O (mg/L) | MnSO ₄ .H ₂ O (mg/L) | ZnSO ₄ .7H ₂ O (mg/L) | CoCl ₂ (mg/L) |
|-------|--|---|----------------------------|--|---|--|-----------------------------|
| -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 2 | 0,3 | 0,3 | 5 | 1,56 | 1,4 | 2 |

FONTE: A autora (2017)

Foram executados nove experimentos, sendo oito determinados pelo software *Statistica*® versão 8.0 e um controle negativo, no qual não houve adição de sais. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

5.2.12. Avaliação da influência das fontes de nitrogênio sobre a produção de enzimas

Foram verificados os efeitos das fontes de nitrogênio utilizadas no meio Mandels e Weber (1969) sobre as atividades das quatro enzimas avaliadas. Os ensaios do teste continham a mistura padrão das duas fontes (ureia e sulfato de amônio) ou a fonte isolada, mantendo sempre a concentração de nitrogênio definida no artigo de origem. Foram aplicadas as condições definidas no item anterior mais as fontes de nitrogênio (sulfato de amônio e ureia).

5.2.13. Otimização do meio para a produção de enzimas (hemi)celulolíticas

Após a avaliação da necessidade da suplementação mineral do meio e da análise das fontes de nitrogênio a serem aplicadas, foi feito um planejamento fatorial do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), avaliando a proporção de palma no meio de cultivo, a concentração de nitrogênio total na solução nutritiva e a proporção das duas fontes de nitrogênio na solução. Os níveis de cada fator estão

dispostos na TABELA 5-4.

TABELA 5-4– NÍVEIS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR PARA ESTUDO DOS FATORES PROPORÇÃO DE PALMA, CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO E PROPORÇÃO UREIA E SULFATO DE AMÔNIO SOBRE A PRODUÇÃO DAS (HEMI)CELULASES POR *Aspergillus* sp. E *Aspergillus niger* NRRL 326

| Níveis | Proporção de palma (% m/v) | Concentração de nitrogênio (g/L) | Proporção Ureia x Sulfato de Amônio (%) |
|----------|----------------------------|----------------------------------|---|
| -1,68179 | 0,16 | 0,070 | 7,96 x 92,04 |
| -1 | 0,5 | 0,219 | 25 x 75 |
| 0 | 1,0 | 0,437 | 50 x 50 |
| 1 | 1,5 | 0,655 | 75 x 25 |
| 1,68179 | 1,84 | 0,804 | 92,04 x 7,96 |

FONTE: A autora (2017)

5.2.14. Validação do modelo matemático

As respostas que apresentaram interação significativa, e permitiram a obtenção de uma superfície de resposta válida, serviram como base para a obtenção de um modelo estatístico que teoricamente descreve o comportamento das atividades enzimáticas a partir de alterações no meio de produção. Para avaliação da validade desses modelos obtidos, foi repetido um ponto da área ótima e o resultado das atividades comparado com o modelo teórico. A análise dos dados e obtenção do modelo foram delineadas no *software Statistica* versão 8.0.

5.2.15. Cinética de produção de (hemi)celulases

Após a validação do modelo e escolha das condições de fermentação, foi executada uma análise da produção de enzimas de acordo com o tempo de cultivo, durante 12 dias. O processo fermentativo foi desenvolvido utilizando o meio nas condições otimizadas; a 30°C e 120 rpm. Os testes foram feitos em duplicata, com análise diária.

5.2.16. Produção das enzimas em biorreatores tipo coluna de bolhas

O processo fermentativo para produção das enzimas foi realizado em biorreatores do tipo coluna de bolhas com volume de 1 L, nas condições otimizadas. Como controle, foram também produzidas, simultaneamente, nas condições anteriores, em frascos de Erlenmeyer. Posteriormente, estudou-se a produção nos reatores com diferentes aerações (1, 1,5 e 2 vvm), mantendo as condições de preparo do meio e taxa de inoculação.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Caracterização do resíduo

A composição centesimal do resíduo utilizado na fermentação está apresentada na TABELA 5-5.

TABELA 5-5 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO RESÍDUO DE EFB UTILIZADO NO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS (HEMI)CELULOLÍTICAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS

| Componente | Composição |
|-----------------------------|-------------------|
| Celulose | 30,475 ± 2,278 |
| Hemicelulose | 19,529 ± 2,959 |
| Lignina | 21,387 ± 0,777 |
| Cinzas | 1,296 ± 0,303 |
| Extraíveis em éter | 4,469 ± 0,023 |
| Extraíveis em etanol | 4,328 ± 0,183 |
| Extraíveis em água | 2,344 ± 0,105 |
| Grupos acetato | 5,257 ± 0,291 |
| Umidade | 6,815 ± 0,156 |

FONTE: A autora (2017)

Em trabalhos anteriores do PPGEBB com EFB, foram obtidos 28% de celulose, 24,12% de hemicelulose e 19,96% de lignina (MEDINA et al., 2015), dados semelhantes aos encontrados no presente estudo. Chiesa e Gnansounou (2014) também encontraram valores similares em EFB do Benin, com 29,6% de celulose, 18,8% de hemicelulose e 22,9% de lignina. Já Kim e Kim (2013) e Yunus e colaboradores (2010) encontraram valores muito superiores de celulose utilizando EFB da Malásia, com 39,8% e 44,5%, respectivamente. Aqueles autores ainda encontraram valor maior também de lignina (28,8%), enquanto o destes foi semelhante (19,1%). Cardona e colaboradores (2018), analisando EFB da Colômbia, encontraram conteúdo celulósico de 35,4%, hemicelulósico de 21,9% e 19% de lignina, valores também não muito distantes do encontrado no presente trabalho. Os dados obtidos mostram como fatores ambientais podem alterar as características de composição do material lignocelulósico oriundo da mesma espécie vegetal, uma vez que resultados com EFB brasileiro mostraram semelhança entre si e diferença em relação aos dados obtidos em outros países.

Foram também quantificados os íons liberados no tratamento térmico do resíduo, como mostrado na TABELA 5-6:

TABELA 5-6 – ÍONS DETECTADOS NO EXTRATO DOS CACHOS VAZIOS DOS FRUTOS DA PALMA APÓS O TRATAMENTO TÉRMICO

| Íon | Concentração (mg/g de EFB) |
|-----------------------------------|----------------------------|
| NH₄⁺ | 0,19 |
| Mg²⁺ | 2,23 |
| Ca²⁺ | 2,44 |
| K⁺ | 104,48 |
| Na⁺ | 3,59 |
| Cl⁻ | 0,20 |
| F⁻ | 0,02 |

FONTE: A autora (2018)

A análise das concentrações de íons obtidas permite inferir possíveis influências da composição do extrato sobre o crescimento microbiano e produção de celulases, comparando-a com a constituição iônica dos meios comumente utilizados e descritos na literatura. Meios consagrados como aquele desenvolvido por Mandels e Weber (1969) requerem a adição de K⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺, expressivos no extrato

analisado. Dessa forma, essas características podem influenciar na elaboração do meio de cultivo, a disponibilização desses elementos pelo extrato do resíduo pode reduzir e até mesmo eliminar a necessidade de suplementação.

5.3.2. Seleção de linhagens produtoras de enzimas (hemi)celulolíticas

A produção do consórcio enzimático foi realizado em dois meios de cultivo diferentes, a saber, o meio clássico para produção de celulases desenvolvido por Mandels e Weber (1969) e um meio utilizado para produção de consórcio de hemicelulases e celulases, desenvolvido por Neoh e colaboradores (2014). Foram utilizadas sete cepas dos gêneros *Aspergillus*, *Colletotrichum* e *Trichoderma*. O desempenho dos micro-organismos nos respectivos meios para produção de celulases e hemicelulases estão dispostos na TABELA 5-7 :

TABELA 5-7 – ATIVIDADES (HEMI)CELULOLÍTICAS DAS ENZIMAS PRODUZIDAS POR DIFERENTES LINHAGENS DE FUNGOS FILAMENTOSOS

| Cepas | Seleção de cepas | | | | | | | | | |
|---|------------------|---------------|----------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|---------------|--------|--------|
| | Fpase (U/mL) | | CMCase (U/mL) | | Xilanase (U/mL) | | Mananase (U/mL) | | | |
| | Meio 1 | Meio 2 | Meio 1 | Meio 2 | Meio 1 | Meio 2 | Meio 1 | Meio 2 | Meio 1 | Meio 2 |
| <i>Aspergillus</i> sp. | 4,002 ± 0,267 | 4,167 ± 0,295 | 23,149 ± 1,075 | 21,464 ± 0,909 | 53,879 ± 5,343 | 156,789 ± 11,527 | 0,169 ± 0,009 | 0,211 ± 0,018 | | |
| <i>Trichoderma harzianum</i> TRIC 03 | 2,379 ± 0,096 | 1,103 ± 0,073 | 15,414 ± 1,056 | ----- | 36,089 ± 1,301 | 4,694 ± 0,293 | 0,346 ± 0,009 | 0,021 ± 0,002 | | |
| <i>Trichoderma</i> sp. TRIC 05 | 3,463 ± 0,382 | 1,173 ± 0,089 | 17,277 ± 0,727 | ----- | 103,120 ± 11,545 | 16,645 ± 0,963 | 0,272 ± 0,009 | 0,173 ± 0,015 | | |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> TRIC04 | 2,547 ± 0,110 | 1,009 ± 0,078 | 19,654 ± 0,762 | ----- | 39,927 ± 0,111 | 8,497 ± 0,233 | 0,278 ± 0,014 | 0,026 ± 0,001 | | |
| <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326 | 1,777 ± 0,154 | 2,898 ± 0,280 | 7,175 ± 0,619 | 8,812 ± 0,427 | 115,300 ± 7,640 | 123,414 ± 1,522 | 0,279 ± 0,011 | 1,616 ± 0,045 | | |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f. sp. <i>aeschynomene</i> TRIC02 | 4,083 ± 0,194 | 2,018 ± 0,085 | 18,025 ± 0,605 | ----- | 169,186 ± 0,413 | 17,721 ± 0,446 | 0,325 ± 0,009 | 0,290 ± 0,009 | | |
| <i>Aspergillus niger</i> NRRL 328 | 2,357 ± 0,186 | 1,237 ± 0,017 | 6,523 ± 0,649 | 4,516 ± 0,224 | 78,418 ± 6,976 | 35,070 ± 5,754 | 0,519 ± 0,049 | 0,169 ± 0,031 | | |

FONTE: A autora (2016)

LEGENDA: Meio 1 - Mandels and Weber (1969)

Meio 2 - Neoh et al. (2014)

Dos micro-organismos testados, o *Aspergillus* sp. - fungo isolado da palma - apresentou maior atividade celulolítica tanto para FPase ($4,002 \pm 0,267$ e $4,167 \pm 0,295$ para os meios 1 e 2, respectivamente) quanto para CMCCase ($23,149 \pm 1,075$ e $21,464 \pm 0,909$ para os meios 1 e 2) para os dois meios de cultivo utilizados, enquanto que as outras cepas, com exceção do *Aspergillus niger* NRRL 326, tiveram redução na produção de celulases no meio desenvolvido por Neoh et al. (2014). Como o *Aspergillus* sp. foi isolado da palma e, conseqüentemente, está habituado a utilizá-la como substrato em seu metabolismo, essa resposta já era esperada. Uma análise estatística entre as atividades obtidas nas produções nos dois meios mostrou que, para 95% de confiança, apenas o *Aspergillus* sp. se mostrou adaptável às mudanças de condições do bioprocessamento no que diz respeito às atividades de FPase, CMCCase e xilanase.

Os demais micro-organismos também apresentaram atividade, com destaque para o *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* TRIC02, que apresentou tanta atividade de FPase quanto o *Aspergillus* sp., embora tenha mostrado menor atividade de CMCCase. Da mesma forma, o *Trichoderma* sp. TRIC05 produziu todas as enzimas, com destaque para a FPase, CMCCase e xilanase. Em relação às hemicelulases, as duas linhagens de *Aspergillus niger* e o *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* TRIC02 testadas apresentaram maior atividade de xilanase e mananase quando comparados aos demais testados.

Em termos de celulases, as linhagens de *Trichoderma* (HB03), *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* e *Aspergillus* sp. mostraram-se no mesmo patamar de produção, entre si para 95% de confiança, em termos de FPase, no meio Mandels e Weber. Tais atividades foram superiores a algumas encontradas na literatura, tais como obtidas por Jing e colaboradores (2015), que, utilizando linhagem mutada de *Penicillium oxalicum* em meio com celulose microcristalina (Avicel®) e farelo de trigo como fonte de carbono, obtiveram atividade de FPase de 2,74 U/mL e 13 U/mL de CMCCase.

É notável a diferença de ordem de grandeza entre as atividades, destacando a produção de xilanase em comparação às demais; esse fenômeno provavelmente se dá devido à composição do resíduo e sua recalcitrância; por não ser um resíduo pré-tratado, a celulose é protegida do ataque microbiano pela matriz de lignina e a

hemicelulose, por estar mais exposta na estrutura lignocelulósica, está mais facilmente disponível para ser utilizada como fonte de carbono pelo micro-organismo.

Utilizando uma linhagem mutada de *Penicillium janthinellum* fermentando palha de trigo, Sharma B. e colaboradores (2015) obtiveram atividades de até 1,85 U/mL para FPase, 39 U/mL para CMCase e 69,3 U/mL para xilanase (em condições diferentes), valores similares aos encontrados nesse estudo, ainda que inferiores para a maioria das Fpases e xilanases e superiores para CMCase.

Vasconcellos e colaboradores (2015) utilizaram *Aspergillus niger* para produzir endoglucanases e xilanases, por fermentação submersa e em estado sólido, a partir de bagaço de cana-de-açúcar tratado por explosão a vapor, obtendo atividades de 0,908 U/mL para endoglucanase e 4,419 U/mL de xilanase. Os resultados encontrados são inferiores aos obtidos nesse trabalho, que ainda utilizou resíduo sem pré-tratamento.

A maioria das linhagens de *Trichoderma* não apresentou atividade expressiva de xilanase e, portanto, tais micro-organismos foram logo descartados, bem como o *Colletotrichum gloesporioides*. Dentre eles, mostrou maior capacidade de produção, nas condições aplicadas, o *Trichoderma* sp. TRIC05, com atividade de $93,120 \pm 11,544$ U/mL. Tal resultado caracterizou ainda uma menor produção que aquela das demais linhagens. Pathak, Bhardwaj e Singh (2014) encontraram produção de xilanase (122 U/mL) por *Trichoderma harzianum*, utilizando farelo de trigo como substrato. Contudo, a fermentação apresentou menores valores de produção de celulases (0,47 U/mL) e endoglucanases (1,67 U/mL). Provavelmente a grande diferença de atividade obtida se deve ao fato de que os resíduos de trigo geralmente possuem teor de hemiceluloses maiores que os de celulose. (PATHAK; BHARDWAJ; SINGH, 2014).

Dos dois *Aspergillus niger* estudados, o NRRL 326 apresentou maior produção de xilanase do que o NRRL 328, sendo este último ainda de difícil manipulação para o processo fermentativo, uma vez que possui menor taxa de esporulação que o primeiro (dados observados apenas). Dadas as considerações feitas, foram selecionados para o teste de capacidade hidrolítica o *Aspergillus* sp., o *Colletotrichum gloesporioides* f. sp. *aeschynomene* e o *Aspergillus niger* NRRL 326.

No âmbito da seleção do meio, foi avaliado que a produção das enzimas se deu mais eficientemente quando foi utilizado o meio Mandels e Weber, sendo que o *Aspergillus* sp. foi o único que mostrou, para FPase, CMCase e xilanase, capacidade adaptativa, tendo produzido as três enzimas em quantidades estatisticamente iguais nos dois meios. Desse modo, como os experimentos prosseguiriam com três cepas, decidiu-se manter o meio ao qual todos os micro-organismos se adaptaram e tiveram bom nível de produção.

Para definir quais cepas seriam mais adequadas para o desenvolvimento do processo fermentativo, foi feita uma nova fermentação, nas mesmas condições, com os micro-organismos previamente selecionados, além de um teste de hidrólise enzimática, que avaliou a capacidade dos extratos enzimáticos em produzir glicose quando atuando sobre a palma pré-tratada. Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 5-8:

TABELA 5-8 – COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE ENZIMAS DOS MICRO-ORGANISMOS TESTADOS E PRODUÇÃO DE GLICOSE A PARTIR DE SEUS EXTRATOS

| Seleção de cepas | | | | | |
|-----------------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|---------------|
| Cepas | Fpase (U/mL) | CMCase (U/mL) | Xilanase (U/mL) | Mananase (U/mL) | Glicose (g/L) |
| <i>Aspergillus</i> sp. | 4,349 ± 0,1634 | 15,910 ± 0,685 | 70,524 ± 0,377 | 0,177 ± 0,007 | 1,50 |
| <i>Colletotrichum aeshynomene</i> | 3,809 ± 0,228 | 15,471 ± 1,074 | 99,008 ± 16,907 | 0,570 ± 0,003 | 0 |
| <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326 | 2,893 ± 0,191 | 13,867 ± 1,025 | 121,840 ± 6,123 | 0,472 ± 0,010 | 3,56 |

FONTE: A autora (2016)

A análise dos resultados da TABELA 5-8 mostra que o padrão das atividades anteriores se manteve, com ligeira redução no valor absoluto da atividade. Essa redução pode ser consequência das variações no tempo e concomitante falha no sistema de controle do equipamento de incubação. Contudo, dentre eles, o *Aspergillus* sp. permaneceu como melhor produtor de celulasas nas condições utilizadas, seguido pelo *Colletotrichum*. Em contrapartida, os extratos dos dois *Aspergillus* foram capazes de levar a uma produção de glicose. A diferença na produção de glicose pode ser devida à ausência de enzimas β -glucosidases no

consórcio produzido nas condições definidas, seja por condição genética (não possuir o gene que expressa tal enzima) ou ambiental, relacionada às condições de cultivo. Dessa forma, o *Aspergillus* sp. e o *Aspergillus niger* NRRL 326 foram selecionados para prosseguimento dos testes para produção das enzimas.

5.3.3. Suplementação mineral

Após a seleção dos micro-organismos, foi elaborado um planejamento Plackett-Burman para avaliar a necessidade de suplementação mineral do meio de cultivo, uma vez que o EFB, quando em solução aquosa, libera íons que podem ser assimilados pelo micro-organismo e utilizados em seu metabolismo. As TABELAS 5-9 e 5-10 apresentam os resultados obtidos no planejamento para as quatro enzimas

TABELA 5-9--ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS NOS ENSAIOS COM CONDIÇÕES DEFINIDAS PELO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN PARA *Aspergillus* sp.

| Ensaio | Fpase (U/mL) | CMCase (U/mL) | Xilanase (U/mL) | Mananase (U/mL) |
|--------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 4,229 ± 0,057 | 19,523 ± 0,143 | 101,017 ± 1,907 | 0,286 ± 0,018 |
| 2 | 4,048 ± 0,099 | 17,947 ± 0,359 | 70,817 ± 0,887 | 0,223 ± 0,020 |
| 3 | 4,405 ± 0,291 | 19,217 ± 0,862 | 101,989 ± 5,677 | 0,211 ± 0,019 |
| 4 | 3,610 ± 0,016 | 17,210 ± 0,754 | 56,862 ± 4,12 | 0,192 ± 0,017 |
| 5 | 3,304 ± 0,071 | 17,032 ± 0,359 | 108,136 ± 3,725 | 0,183 ± 0,003 |
| 6 | 3,354 ± 0,057 | 16,270 ± 0,575 | 79,034 ± 3,016 | 0,168 ± 0,003 |
| 7 | 3,304 ± 0,057 | 16,930 ± 1,078 | 77,027 ± 0,177 | 0,177 ± 0,003 |
| 8 | 3,2538 ± 0,028 | 18,505 ± 1,293 | 78,062 ± 4,213 | 0,164 ± 0,012 |
| 9 | 4,566 ± 0,149 | 18,505 ± 0,718 | 93,585 ± 5,588 | 0,238 ± 0,008 |

FONTE: A autora (2017)

As atividades dispostas na TABELA 5-9 mostram que, para o *Aspergillus* sp. o ensaio 9 apresentou maior capacidade hidrolítica do papel de filtro (FPase), levando à produção de 4,566 ± 0,149 U/mL, cujas condições de produção era a ausência total de suplementação. Este também apresentou a mesma atividade de

CMCase (18,505 U/mL) que o ensaio 8, que é caracterizado pela presença de todos os suplementos minerais. O ensaio sem suplementação também mostrou atividade de xilanase próxima dos maiores ($93,585 \pm 5,588$ U/mL) resultados obtidos, bem como a mananase ($0,238 \pm 0,008$ U/mL). As condições aplicadas no ensaio 3 (presença de $MgSO_4$, $MnSO_4$ e $CoCl_2$) levaram a resultados estatisticamente semelhantes àqueles obtidos sem suplementação. Porém, como o custo do meio sem suplementação é inferior, o ensaio 9 possui as melhores características para desenvolvimento do bioprocesso.

TABELA 5-10 – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS NOS ENSAIOS COM CONDIÇÕES DEFINIDAS PELO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN PARA *Aspergillus niger* NRRL 326.

| Ensaio | Fpase | CMCase | Xilanase | Mananase |
|--------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|-------------------------------------|
| 1 | $2,067 \pm 0,256$ | $8,635 \pm 0,810$ | $86,435 \pm 19,691$ | $0,312 \pm 0,030$ |
| 2 | $2,414 \pm 0,235$ | $7,765 \pm 0,600$ | $91,170 \pm 2,439$ | $0,392 \pm 0,031$ |
| 3 | $2,268 \pm 0,256$ | $7,680 \pm 0,720$ | $90,512 \pm 1,5966$ | $0,326 \pm 0,008$ |
| 4 | $2,309 \pm 0,270$ | $8,211 \pm 0,270$ | $145,549 \pm 7,939$ | $0,405 \pm 0,032$ |
| 5 | $2,158 \pm 0,256$ | $6,959 \pm 0,480$ | $55,702 \pm 5,499$ | $0,099 \pm 0,001$ |
| 6 | $2,323 \pm 0,220$ | $7,935 \pm 0,360$ | $135,953 \pm 11,753$ | $0,372 \pm 0,007$ |
| 7 | $1,630 \pm 0,121$ | $6,154 \pm 0,420$ | $37,482 \pm 0,754$ | $0,198 \pm 0,017$ |
| 8 | $2,354 \pm 0,192$ | $7,574 \pm 0,090$ | $135,137 \pm 8,826$ | $0,325 \pm 0,021$ |
| 9 | $1,771 \pm 0,007$ | $6,684 \pm 0,330$ | $160,476 \pm 14,769$ | $0,158 \pm 0,070$ |

FONTE: A autora (2017)

A TABELA 5-10 mostra as atividades obtidas para o *Aspergillus niger* NRRL 326. A enzima mais expressiva do consórcio para esse micro-organismo é a xilanase, tanto que ele já foi previamente utilizado para este fim dentro do grupo de pesquisa (GOELZER, 2015). O ensaio sem suplementação apresentou a atividade xilanolítica mais expressiva ($160,476 \pm 14,769$ U/mL), embora as celulasas estejam em menor atividade, ao lado do ensaio 4 ($145,549 \pm 7,939$).

Após os experimentos iniciais de ajuste dos sais para ambas as cepas, e respectivas análises estatísticas, foi obtida a TABELA 5-11, em que são apresentados os efeitos de cada um dos sais utilizados nos processo fermentativo

sobre as atividades das quatro classes de enzimas. Os sinais negativos (-) indicam efeito negativo significativo sobre a atividade enzimática, os sinais positivos (+) efeitos positivos e os zeros (0) indicam que não houve efeito significativo sobre a atividade.

TABELA 5-11 – EFEITOS DAS VARIÁVEIS SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS PARA AS DUAS CEPAS

| | <i>Aspergillus sp.</i> | | | | <i>Aspergillus niger</i> | | | |
|-------------------------------------|------------------------|--------|----------|----------|--------------------------|--------|----------|----------|
| | Fpase | CMCase | Xilanase | Mananase | Fpase | CMCase | Xilanase | Mananase |
| KH₂PO₄ | - | - | - | - | + | + | + | + |
| MgSO₄ | 0 | 0 | - | - | 0 | 0 | 0 | + |
| CaCl₂ | - | - | 0 | - | 0 | - | - | - |
| FeSO₄ | - | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | 0 |
| MnSO₄ | + | + | + | 0 | 0 | + | + | + |
| ZnSO₄ | 0 | 0 | - | + | 0 | 0 | - | 0 |
| CoCl₂ | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | - | 0 |

FONTE: A autora (2017)

LEGENDA: (-) efeito negativo; (+) efeito positivo; (0) efeito não significativo

A remoção dos sais do meio fermentativo sinaliza uma redução no custo de produção e uma definição da capacidade que o resíduo utilizado tem de prover ao micro-organismo os elementos necessários para sua sobrevivência e interconsequente produção das enzimas de interesse.

Na TABELA 5-11, pode-se ver que, para o *Aspergillus sp.* o KH₂PO₄ apresentou um efeito significativo negativo para todas as enzimas analisadas, o que pode ser justificado pelo fato de que a própria palma possui uma concentração de íons potássio solúveis em sua estrutura, que são disponibilizados no meio quando neste é suspenso o EFB. Contudo, para o *Aspergillus niger* NRRL 326 não foi observado o mesmo padrão, havendo uma maior demanda pelo sal para este último. É necessário, então, salientar que o *Aspergillus sp.* é um micro-organismo isolado da palma e, provavelmente, já estando adaptado ao meio de crescimento, não demandou a adição do sal, ao contrário do *Aspergillus niger* NRRL 326. O KH₂PO₄ é frequentemente utilizado em meios de cultivo por influenciar no pH do meio, uma vez

que possui efeito tamponante (PUBCHEM, 2019), podendo assim evitar variações de pH que prejudiquem o crescimento do micro-organismo.

Adicionalmente, a produção de biomassa está associada à presença de íons fosfato atuantes como fontes de fósforo que, juntamente ao carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio e enxofre, é um dos macroatomantes determinantes para manutenção da vida microbiana (MADIGAN et al., 2015).

Maceno e colaboradores (2016) encontraram influência positiva na presença de KH_2PO_4 , para produção de FPase utilizando EFB como substrato em fermentação semissólida, tendo como micro-organismo produtor o *Phanerochaete* sp. Os pesquisadores alcançaram, na presença do sal atividade de 0,24 U/mL, enquanto que na ausência do sal atingiram valores inferiores a 0,114 U/mL. O padrão foi semelhante ao mostrado pelo *Aspergillus niger* NRRL 326 e em oposição ao *Aspergillus* sp.. A avaliação também foi feita a partir da presença e ausência dos sais do meio Mandels e Weber.

Han e colaboradores (2017), produzindo celulasas utilizando farelo de trigo e torta de soja como substratos, com *Penicillium oxalicum*, avaliaram que a presença de KH_2PO_4 não influenciou significativamente na produção das FPase, mantendo resultados de atividade entre 5 e 6 U/mL.

Desta forma, foi decidido remover os sais $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e CaCl_2 , por terem apresentado efeito nulo ou negativo sobre quase todas as atividades das enzimas avaliadas, uma vez que cálcio e magnésio também fazem parte da composição iônica liberada pela palma no meio.

Para o *Aspergillus* sp. o extrato sem adição de sais mostrou-se satisfatório, não apresentando grandes diferenças nas principais atividade. Dessa forma, levando em consideração o custo-benefício de produzir as enzimas sem a necessidade de suplementação, decidiu-se manter o meio apenas com a adição das fontes de nitrogênio e eliminar a adição de sais.

Para o *Aspergillus niger* NRRL 326 foi possível notar a influência positiva do sulfato ferroso sobre a atividade de endoglucanase (CMCase), como pode ser observado na TABELA 5-10, em que estão presentes as atividades absolutas em cada um dos ensaios, com atividades acima de 8 U/mL para pontos que possuem

em comum a presença do FeSO_4 (pontos 1 e 4). O sulfato de zinco não apresentou influência significativa positiva para nenhuma das enzimas, sendo inclusive prejudicial, na concentração adicionada, para a atividade de xilanase.

O cloreto de cobalto, apesar de ser positivamente influente para a atividade de celulase (FPase), apresentou efeito negativo sobre a atividade de xilanase, não sendo portanto interessante para a produção do complexo como um todo. Por fim, da mesma forma que para o *Aspergillus* sp., houve produção da enzima no meio sem suplementação (ensaio 9). Para Maceno e colaboradores (2016) o melhor meio para produção de celulases por *Phanerochaete* sp., utilizando EFB como substrato, ainda requereu a adição do KH_2PO_4 , sendo os demais sais dispensáveis para a produção das enzimas. Dessa forma, também decidiu-se manter a produção das enzimas no meio sem suplementação para o *Aspergillus niger* NRRL 326, com o intuito de reduzir o custo de produção das mesmas.

5.3.4. Avaliação da influência das fontes de nitrogênio sobre a produção de enzimas

Partindo do meio definido no item anterior, manteve-se apenas a fonte de carbono (EFB) e as fontes de nitrogênio: ureia e sulfato de amônio, que foram testadas separadamente e em conjunto, mantendo a concentração final de nitrogênio constante. Foram utilizados dois controles, um sem fontes de nitrogênio e um com a composição padrão (TABELA 5-2, item 5.2.4).

Na TABELA 5-12 estão apresentados os resultados obtidos para o *Aspergillus* sp. utilizando as referidas fontes de nitrogênio.

TABELA 5-12 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS (HEMI) CELULASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus* sp. SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE FONTES DE NITROGÊNIO

| <i>Aspergillus</i> sp. | | | | |
|---|---------------|----------------|------------------|-----------------|
| Fontes de N | Fpase (U/mL) | CMCase (U/mL) | Xilanase (U/mL) | Mananase (U/mL) |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1,643 ± 0,131 | 6,972 ± 0,474 | 115,811 ± 13,988 | 0,039 ± 0,004 |
| Ureia | 2,031 ± 0,107 | 9,873 ± 0,599 | 23,058 ± 1,104 | 0,225 ± 0,001 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ + Ureia | 3,755 ± 0,241 | 13,064 ± 0,326 | 80,951 ± 0,866 | 0,288 ± 0,016 |
| Controle negativo | 0,623 ± 0,070 | 2,549 ± 1,045 | 17,504 ± 1,530 | 0,045 ± 0,004 |

FONTE: A autora (2017)

Os melhores resultados para as celulases (3,755 ± 0,241 U/mL para Fpase e 13,064 ± 0,326 U/mL para CMCase) e a mananase foram obtidos no meio composto com as duas fontes de nitrogênio, enquanto que para a xilanase o sulfato de amônio sozinho promoveu uma maior produção de enzima (115,811 ± 13,998 U/mL). Visto isso e somado a tal o fato de que a atividade de xilanase no meio clássico ainda foi expressiva, decidiu-se por manter o meio inicial, composto por 1,4 g/L de sulfato de amônio e 0,3 g/L de ureia.

Para o *Aspergillus niger* NRRL 326, todas as enzimas apresentaram maior atividade no meio que continha as duas fontes de nitrogênio, como pode ser visto na TABELA 5-13. Dessa forma, também para esse micro-organismo foi mantido o meio inicial, com 1,4 g/L de sulfato de amônio e 0,3 g/L de ureia.

TABELA 5-13 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS (HEMI)CELULASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus niger* NRRL 326 SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE FONTES DE NITROGÊNIO

| <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326 | | | | |
|---|---------------|---------------|-----------------|-----------------|
| | Fpase (U/mL) | CMCase (U/mL) | Xilanase (U/mL) | Mananase (U/mL) |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1,265 ± 0,024 | 5,574 ± 0,494 | 85,471 ± 0,578 | 0,468 ± 0,019 |
| Ureia | 0,420 ± 0,012 | 0,727 ± 0,065 | 16,807 ± 1,399 | 0,056 ± 0,004 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ + Ureia | 1,979 ± 0,082 | 8,358 ± 0,304 | 132,592 ± 6,408 | 0,532 ± 0,004 |
| Controle negativo | 0,465 ± 0,064 | 0,575 ± 0,063 | 23,756 ± 1,882 | 0,044 ± 0,006 |

FONTE: A autora (2017)

Zhang e Sang (2015) também identificaram que a mistura das fontes orgânica e inorgânica de nitrogênio leva às melhores respostas para produção de xilanase e mananase por *Penicillium chrysogenum*, sendo que os pesquisadores utilizaram sulfato de amônio e extrato de levedura como fontes. Paralelamente, Adhyaru, Bhatt e Modi (2015) encontraram o mesmo comportamento para produção de celulases e xilanases.

D. Jung e colaboradores (2015) observaram comportamento semelhante aquele apresentado pelo *Aspergillus niger* NRRL 326, em que a utilização de ureia em maiores concentrações inibiu a produção de endoglucanases (CMCase). Em seu estudo, os autores verificaram redução na atividade de 0,97 para 0,3 U/mL, uma consequência do aumento na concentração de ureia no meio de 1,2 para 2,8 g/L. Concomitantemente, quando aplicaram sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, os pesquisadores detectaram que as atividades enzimáticas dos sistemas produzidos sob maior concentração de $\text{NH}_4(\text{SO}_2)$ (3,8 g/L) se mostraram mais elevadas, numa faixa superior a 0,9 U/mL. Os pesquisadores produziram a endoglucanase utilizando palha de milho como substrato e *Penicillium brasilianum* como micro-organismo produtor.

Uma fonte inorgânica de nitrogênio, como o sulfato de amônio, por ser de fácil assimilação pelo micro-organismo, pode induzir o crescimento mais acelerado do que aquele obtido por fontes orgânicas. Seu uso isolado, entretanto, causa flutuações de pH durante o crescimento, podendo causar inibição da produção das enzimas. As moléculas orgânicas, por sua vez, são mais adequadas para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, associados à maior produção de biomassa (BAI et al., 2017). A combinação de fontes orgânicas e inorgânicas é, portanto, mais adequada para a produção de enzimas, principalmente quando sua condição de produção exige um pH característico.

5.3.5. Otimização do meio de cultivo para produção de enzimas (hemi)celulolíticas utilizando *Aspergillus* sp.

As melhores condições do meio de cultivo para produção do complexo enzimático, contendo celulases e hemicelulases, foram estudadas em um

planejamento fatorial DCCR 2³, tomando como base os experimentos anteriores. De modo que o meio continha apenas as duas fontes de nitrogênio e a palma. Com a análise estatística foi possível determinar os pontos ótimos para a concentração de nitrogênio e a proporção da duas fontes utilizadas.

As atividades de cada um dos pontos do planejamento para *Aspergillus sp.* estão dispostas na TABELA 5-14:

TABELA 5-14 – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS NOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DCCR PARA *Aspergillus sp.*

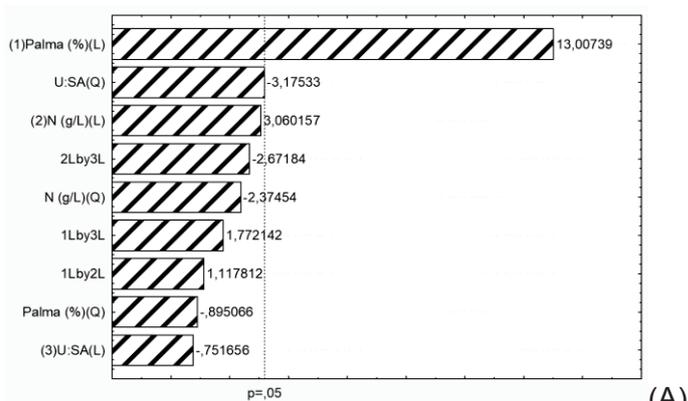
| <i>Aspergillus sp.</i> | | | | | | | |
|------------------------|-----------|------------------------|-------------------|--------------|---------------|-----------------|-----------------|
| Ensaio | Palma (%) | Nitrogênio total (g/L) | Ureia (proporção) | Fpase (U/mL) | CMCase (U/mL) | Xilanase (U/mL) | Mananase (U/mL) |
| 1 | 0,5 | 0,2185 | 0,25 | 1,763 | 10,735 | 13,538 | 0,121 |
| 2 | 0,5 | 0,2185 | 0,75 | 1,310 | 11,314 | 20,246 | 0,213 |
| 3 | 0,5 | 0,6555 | 0,25 | 1,660 | 9,307 | 43,326 | 0,142 |
| 4 | 0,5 | 0,6555 | 0,75 | 1,289 | 9,307 | 24,357 | 0,144 |
| 5 | 1,5 | 0,2185 | 0,25 | 2,639 | 12,581 | 30,992 | 0,204 |
| 6 | 1,5 | 0,2185 | 0,75 | 3,947 | 14,166 | 41,234 | 0,341 |
| 7 | 1,5 | 0,6555 | 0,25 | 4,050 | 13,849 | 117,398 | 0,329 |
| 8 | 1,5 | 0,6555 | 0,75 | 3,257 | 14,166 | 54,216 | 0,416 |
| 9 | 0,16 | 0,437 | 0,5 | 1,062 | 7,194 | 24,285 | 0,134 |
| 10 | 1,84 | 0,437 | 0,5 | 4,019 | 16,490 | 65,756 | 0,388 |
| 11 | 1 | 0,07 | 0,5 | 1,505 | 9,307 | 37,483 | 0,179 |
| 12 | 1 | 0,804 | 0,5 | 2,948 | 12,370 | 64,170 | 0,260 |
| 13 | 1 | 0,437 | 0,0796 | 2,185 | 10,891 | 60,131 | 0,135 |
| 14 | 1 | 0,437 | 0,9204 | 1,928 | 13,321 | 43,181 | 0,324 |
| 15 | 1 | 0,437 | 0,5 | 2,618 | 13,215 | 57,751 | 0,261 |
| 16 | 1 | 0,437 | 0,5 | 3,164 | 12,581 | 57,246 | 0,268 |
| 17 | 1 | 0,437 | 0,5 | 3,061 | 13,215 | 57,534 | 0,281 |
| 18 | 1 | 0,437 | 0,5 | 2,979 | 12,053 | 57,462 | 0,276 |

FONTE: A autora (2017)

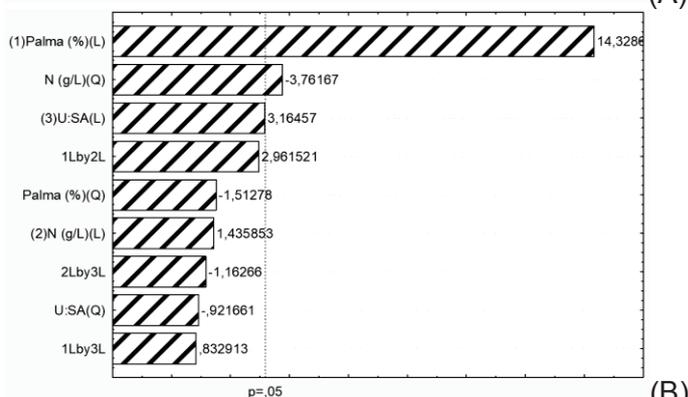
Como apresentado na TABELA 5-14, os melhores ensaios para obtenção da

FPase foram 6, 7 e 10, com atividades de 3,947, 4,050 e 4,010 U/mL respectivamente. Para CMC_{Case}, a melhor condição foi aquela presente no ensaio 10 (16,490 U/mL). Esta, contudo, mostrou atividade de xilanase (65,756 U/mL) 40% menor que a obtida nas condições definidas no ponto 7 (117,398 U/mL), que por sua vez apresentou atividade de CMC_{Case} (13,849 U/mL) apenas 16% menor que o ponto 10. As atividades de mananase não diferiram muito entre os pontos mencionados, diferindo entre si em menos de 3,1%. A atividade de FPase foi considerada como primeiro item de seleção das condições de produção, uma vez que esta possui grande importância nos processos de sacarificação da celulose. Vale também mencionar que o experimento descrito no ponto 7 tem apenas 1,5% de palma, enquanto aquele descrito no ensaio 10 utilizou 1,84% de palma para chegar a valores semelhantes de FPase, de modo que a primeira usaria uma menor quantidade de resíduo, conduzindo à possibilidade de realizar mais vezes o processo com a mesma quantidade de resíduo. Para determinação das condições, porém, é necessário avaliar todos os efeitos das variáveis e suas interações, que estão dispostos nos diagramas de Pareto apresentado na FIGURA 5-1 :

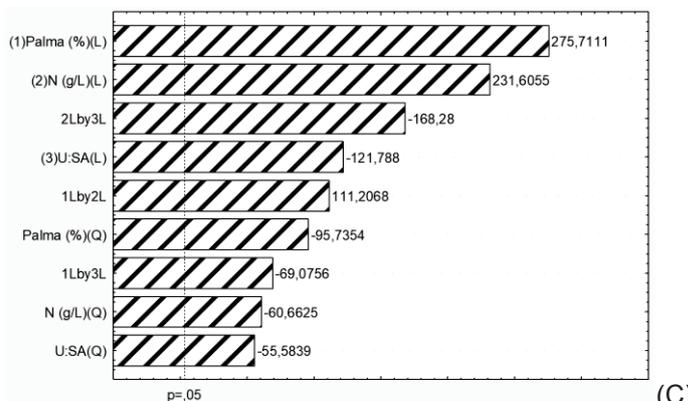
FIGURA 5-1 –DIAGRAMAS DE PARETO COM OS EFEITOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *Aspergillus sp.*



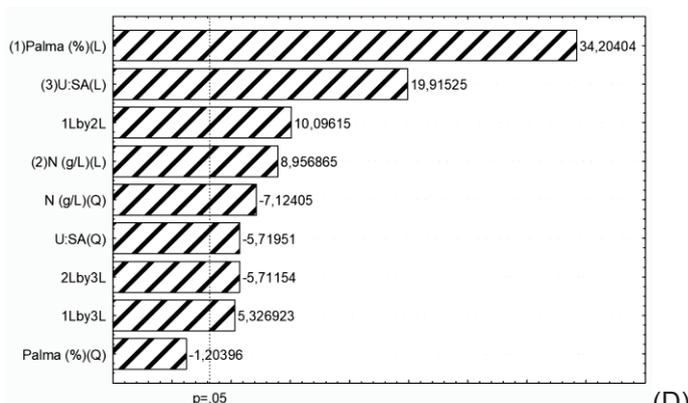
(A)



(B)



(C)



(D)

FONTE: A autora (2017)

LEGENDA: (A) FPase, (B) CMCCase, (C) Xilanase, (D) Mananase

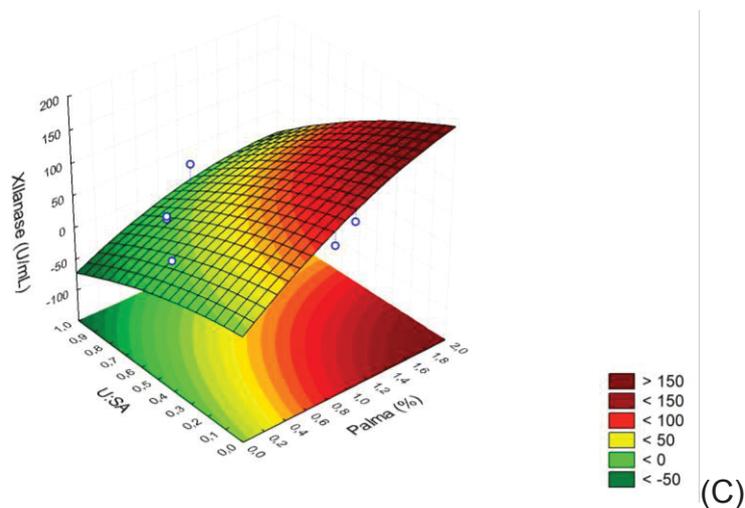
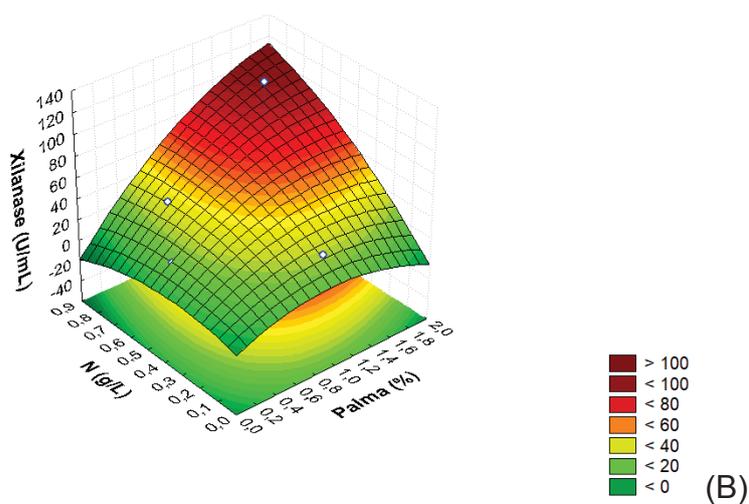
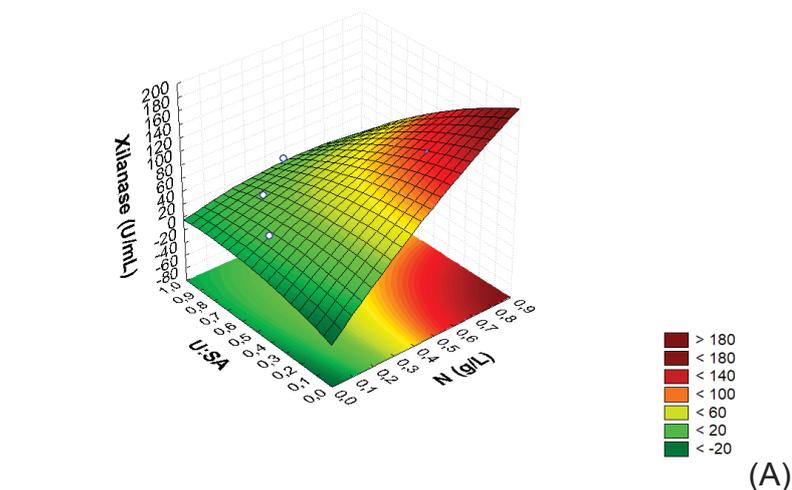
Como indicado nos gráficos, a maior proporção de palma apresentou efeito significativo positivo linear sobre as atividades enzimáticas. Para Fpase, essa tendência pode ser verificada com clareza na TABELA 5-14, uma vez que todas as atividades em torno de 4 U/mL foram obtidas para uma proporção de palma entre 1,5 e 1,84%. Contudo, o efeito quadrático dessa mesma variável não foi significativo. Nesse contexto, é possível inferir que elevar linearmente a quantidade de palma levaria a maiores produções das enzimas, mas elevar em nível quadrático não há influência positiva e nem negativa. Considerando que a produção seja concomitante ao crescimento, e que a distribuição do crescimento até certo ponto da concentração de substrato é exponencial e, seguidamente mantém-se constante, é razoável assumir que uma elevação da proporção da palma realmente não teria efeito sobre a produção das enzimas.

A concentração total de nitrogênio foi também significativa para todas as enzimas, sendo que apenas para CMCase essa influência foi negativa, demandando menor concentração de nitrogênio. A proporção de ureia e sulfato de amônio foi significativa para a FPase e para as hemicelulases, sendo que para esta e para a xilanase, foi detectada que uma maior proporção de sulfato de amônio é favorecida a secreção da enzima.

Valores semelhantes de atividade de Fpase foram obtidos por Nagraj e colaboradores (2014), com máximo de 5,76 U/mL, relativamente superior ao encontrado neste estudo. Foi visto pelos autores que valores equilibrados de ureia e sulfato de amônio com fonte de nitrogênio levaram a melhores respostas na produção das celulasas, mas assim como detectado no presente bioprocessamento, não houve diferença significativa nessa proporção para produção de FPase. A produção dos autores foi feita utilizando farelo de trigo como substrato e *Penicillium janthinellum* como micro-organismo produtor.

Quanto às interações, tiveram efeito significativo sobre a atividade das hemicelulases, sendo que a interação entre a fonte de nitrogênio e suas proporções teve maior influência, sendo esta negativa, de modo que mostram comportamento antagônico. Pode-se concluir que uma combinação de uma menor quantidade de ureia e uma maior concentração de nitrogênio total elevam a atividade xilanolítica. Essa interação e as demais significativas sobre a xilanase e mananase estão dispostas na FIGURA 5-2.

FIGURA 5-2 – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA CARACTERÍSTICAS DAS INTERAÇÕES ENTRE CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO E PROPORÇÃO DE SUAS FONTES SOBRE A ATIVIDADE DE XILANASE (A); PROPORÇÃO DE PALMA SUSPENS E A CONCENTRAÇÃO TOTAL DE NITROGÊNIO SOBRE A ATIVIDADE DE XILANASE(B); PROPORÇÃO DE PALMA SUSPENS E A PROPORÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO E UREIA (C); TENDO COMO RESPOSTA AS ATIVIDADES DE XILANASE PRODUZIDAS POR *Aspergillus* sp.



FONTE: A autora (2017)

A interação mencionada é representada na FIGURA 5-2 (A), onde fica clara a tendência de aumento da atividade enzimática com o aumento da concentração total de nitrogênio concomitante com a maior participação do sulfato de amônio como componente da fonte de nitrogênio. O sulfato de amônio como melhor fonte de nitrogênio, em comparação com a ureia, para a produção de xilanase, também foi detectado no momento da seleção de fontes para a composição do meio. Essa tendência também se observa na FIGURA 5-2(C), em que, mesmo com o aumento da proporção de palma suspensa no meio, esse aumento da presença de sulfato de amônio é requerida, ainda que a própria palma seja fonte do íon amônio.

Outros autores, tais como Thomas, Parameswaran e Pandey (2016) e Sharma e Bajaj (2017) encontraram comportamento diferente no concernente à influência do sulfato de amônio sobre a atividade de xilanase, sendo que o meio contendo o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentou menor produção, quando comparado com outras fontes de nitrogênio. Contudo, os mesmos autores apresentaram que a ureia levou a resultados menores ainda que o sulfato de amônio. É importante salientar que diferentes organismos requerem condições diferentes de produção. A ureia foi mantida por sua presença simultânea com o sulfato de amônio ter se mostrado a melhor condição para as celulases, sem deixar de produzir as hemicelulases.

Na FIGURA 5-2 (B), pode ser vista a reação sinérgica entre as fontes de carbono e nitrogênio, em que o aumento concomitante das duas fontes eleva a atividade xilanolítica. Essa interação mostra que, uma vez que seja aumentada a proporção de palma suspensa, também será necessário aumentar a concentração de nitrogênio no meio. Levando-se em consideração as duas situações e a influência dos fatores principais sobre todas as enzimas, foi necessário encontrar um ponto que favorecesse a atividade das quatro.

Para avaliar a validade das interações obtidas, foram gerados modelos matemáticos que representam a produção de xilanase. Pontos aleatórios foram selecionados para repetição dos testes fermentativos e verificação dos resultados teóricos em comparação com o obtido experimentalmente. Todos os modelos característicos de uma enzima levam ao mesmo resultado, nas mesmas condições. Dessa forma, um modelo de cada foi escolhido para apresentação. O modelo matemático apresentado corresponde à interação entre a concentração total de nitrogênio e a proporção de suas fontes (Equação 5-1):

$$z = -72,543 + 163,343x - 74,526x^2 + 164,393y - 52,062y^2 + 74,931 * 2x - 40,679 * 2y - 226,773xy + 37,351 \quad (5-1)$$

Em que x é a concentração de nitrogênio no meio, y é a proporção de ureia dentre as fontes de nitrogênio e z é a atividade de xilanase (fixado 2% de palma).

Nesse caso, o R² obtido foi de 0,92, sendo o R² ajustado 0,83 para 95% de confiança. Nas condições escolhidas (2% de palma em suspensão, 0,874 g/L de N, sendo 50% oriundo da ureia e 50% do sulfato de amônio), o modelo previu uma atividade de xilanase de 111,023 U/mL. Foi obtida uma atividade de 108,881 ± 4,635 U/mL. Os resultados apresentados estão dentro da margem esperada e mostram que o modelo obtido representa o comportamento da enzima no processo fermentativo. Além das atividades descritas, as condições de região ótima testadas permitiram obter atividades de FPase de 5,442 U/mL e CMCase de 17,635 U/mL. Esses valores podem ser explicados pelas tendências observadas nos Diagramas de Pareto, em que um aumento nas quantidades das fontes de carbono e nitrogênio levaria a um aumento na produção dessas enzimas. Essa condição foi então escolhida para a continuidade dos experimentos com o *Aspergillus* sp.

5.3.6. Otimização do meio de cultivo para produção de enzimas (hemi)celulolíticas utilizando *Aspergillus niger* NRRL 326

No que diz respeito ao *Aspergillus niger* NRRL 326, foi realizado o planejamento experimental do tipo DCCR 2³ nas mesmas condições estudadas para o *Aspergillus* sp, e as respostas obtidas estão dispostas na TABELA 5-15.

TABELA 5-15 – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS NOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DCCR PARA *Aspergillus niger* NRRL 326

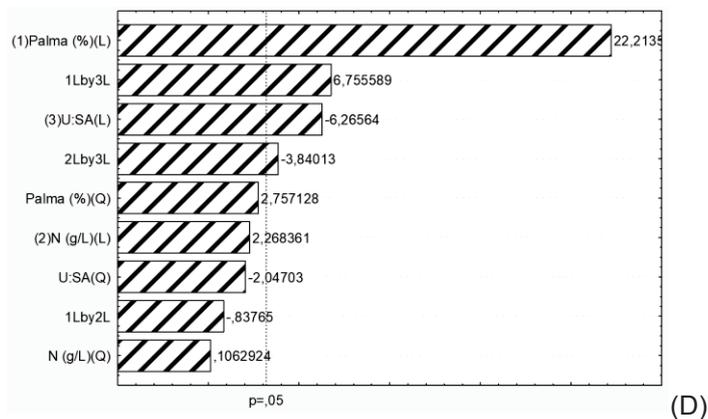
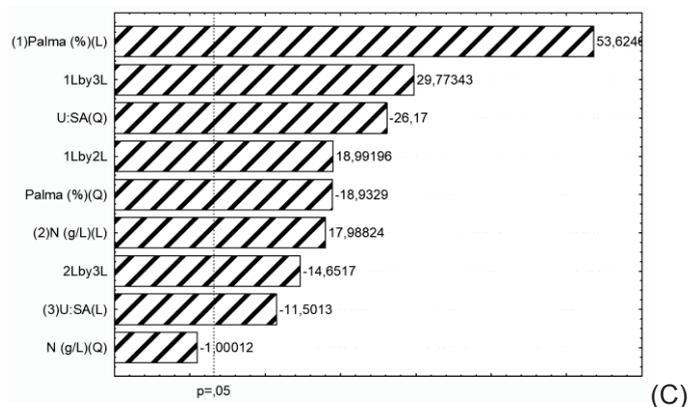
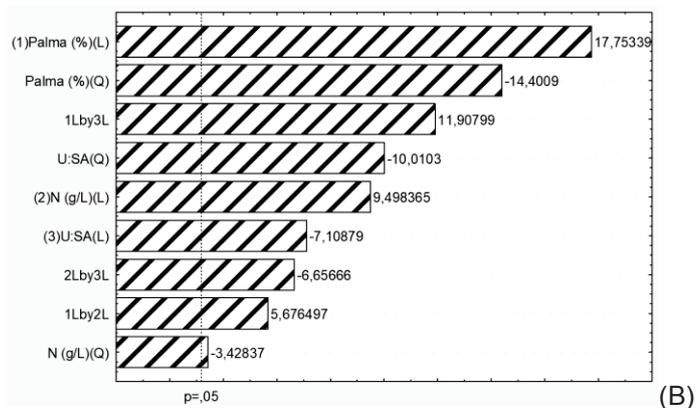
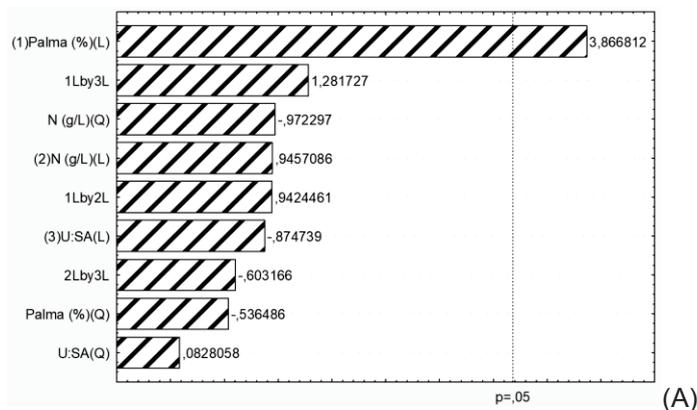
| <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326 | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------|------------------|-------------------|--------------|---------------|-----------------|-----------------|
| Ensaio | Palma (%) | Nitrogênio (g/L) | Ureia (proporção) | Fpase (U/mL) | CMCase (U/mL) | Xilanase (U/mL) | Mananase (U/mL) |
| 1 | 0,5 | 0,2185 | 0,25 | 0,753 | 4,418 | 65,179 | 0,130 |
| 2 | 0,5 | 0,2185 | 0,75 | 0,640 | 2,709 | 42,172 | 0,043 |
| 3 | 0,5 | 0,6555 | 0,25 | 1,196 | 5,709 | 82,634 | 0,164 |
| 4 | 0,5 | 0,6555 | 0,75 | 0,331 | 1,230 | 9,499 | 0,021 |
| 5 | 1,5 | 0,2185 | 0,25 | 1,248 | 3,892 | 62,583 | 0,242 |
| 6 | 1,5 | 0,2185 | 0,75 | 1,413 | 5,455 | 105,353 | 0,328 |
| 7 | 1,5 | 0,6555 | 0,25 | 1,783 | 6,427 | 117,686 | 0,285 |
| 8 | 1,5 | 0,6555 | 0,75 | 2,041 | 6,427 | 134,131 | 0,261 |
| 9 | 0,16 | 0,437 | 0,5 | 0,269 | 1,356 | 10,941 | 0,017 |
| 10 | 1,84 | 0,437 | 0,5 | 1,433 | 5,497 | 97,347 | 0,316 |
| 11 | 1 | 0,07 | 0,5 | 0,702 | 4,018 | 64,386 | 0,092 |
| 12 | 1 | 0,804 | 0,5 | 0,733 | 6,849 | 96,482 | 0,176 |
| 13 | 1 | 0,437 | 0,0796 | 1,248 | 4,652 | 55,875 | 0,163 |
| 14 | 1 | 0,437 | 0,9204 | 0,836 | 3,807 | 31,209 | 0,052 |
| 15 | 1 | 0,437 | 0,5 | 1,794 | 6,511 | 92,298 | 0,183 |
| 16 | 1 | 0,437 | 0,5 | 1,073 | 5,962 | 94,534 | 0,146 |
| 17 | 1 | 0,437 | 0,5 | 1,021 | 6,173 | 96,698 | 0,165 |
| 18 | 1 | 0,437 | 0,5 | 0,980 | 6,300 | 93,669 | 0,159 |

FONTE: A autora (2017)

Na TABELA 5-2, pode ser visto que a maior atividade de FPase foi obtida no ensaio 8, em que houve mais de 2 U/mL. Nesse ponto, também foi detectada a maior atividade de xilanase (134,131 U/mL) e a segunda maior de CMCase (6,427 U/mL). Apenas a mananase apresentou menor atividade, sendo ainda assim superior à maioria dos outros pontos. O ponto 8 é caracterizado por possuir 1,5% de palma suspensa, 0,6555 g/L de nitrogênio, sendo 75% desse N oriundo da ureia e 25% do sulfato de amônio.

A influência de cada uma das variáveis e suas interações estão dispostas nos diagramas de Pareto na FIGURA 5-3.

FIGURA 5-3–DIAGRAMAS DE PARETO COM OS EFEITOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS PARA PRODUÇÃO DE FPASE (A), CMCASE (B), XILANASE (C) E MANANASE (D) POR *Aspergillus niger* NRRL 326



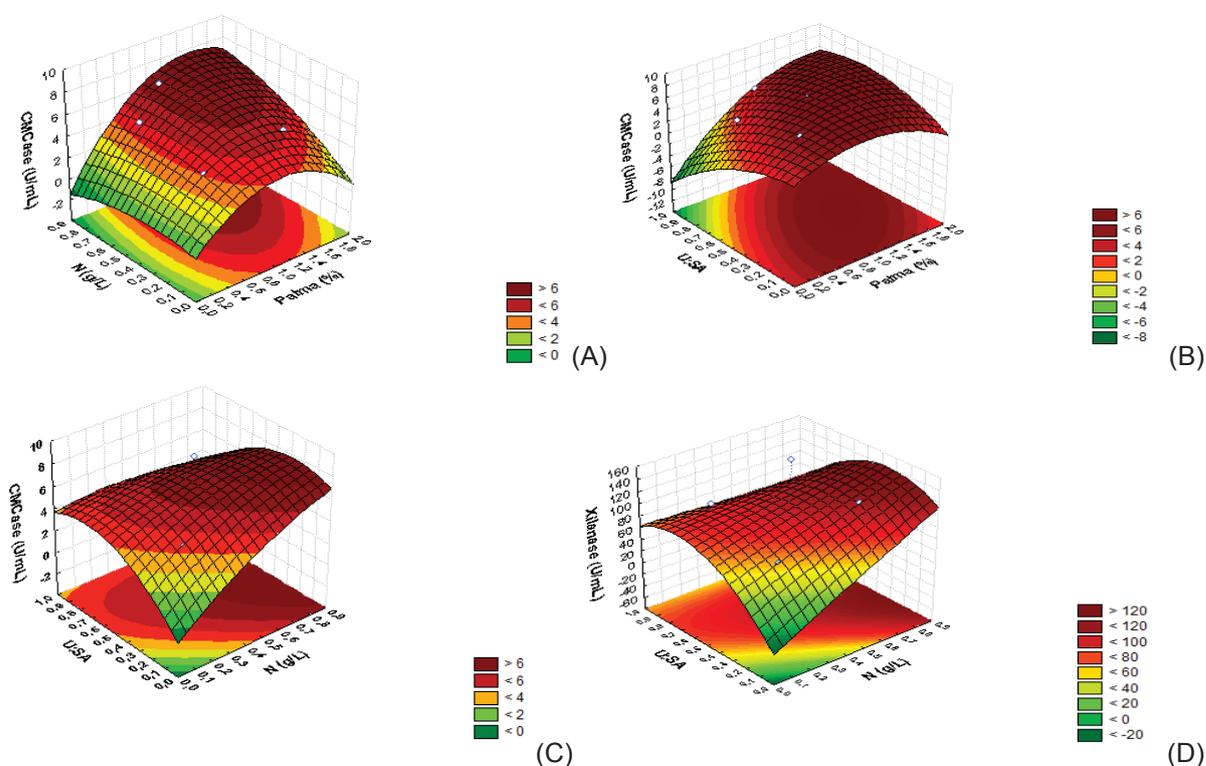
FONTE: A autora (2017)

Para FPase, a única variável com influência significativa foi a proporção de palma, cuja influência linear positiva mostra que um aumento nessa proporção leva a maiores atividades de FPase. A tendência pode ser vista na TABELA 5-15, em que as atividades acima de 1 U/mL são para ensaios em que a proporção de palma está acima de 1% (m/v). Da mesma forma, essa proporção de palma também se mostrou influente para as demais enzimas. Contudo, para CMCase e xilanase, o efeito quadrático da proporção de palma foi significativo negativamente, de modo que as condições precisam ser analisadas em conjunto para decidir a condição de prosseguimento do trabalho.

A concentração de nitrogênio apresentou efeito linear estatisticamente significativo sobre as atividades de endoglucanase (CMCase) e xilanase. A proporção entre as duas fontes de nitrogênio mostrou-se significativa para as atividades de hemicelulases e da endoglucanase, sendo negativa para todas elas, de modo que o ideal é que seja aumentado o teor de sulfato de amônio e reduzido o de ureia. Bagewadi e colaboradores (2016), ao contrário do presente estudo, não encontraram correlação significativa entre as fontes orgânica e inorgânica de nitrogênio, quando produziram xilanase por *Penicillium citrinum* utilizando sorgo doce como substrato.

A observação do efeito da proporção das fontes de nitrogênio dentro das interações com os demais fatores traz uma ideia mais clara do comportamento da atividade enzimática nas condições especificadas. Tais dados são apresentados na FIGURA 5-4:

FIGURA 5-4 – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA CARACTERÍSTICAS DAS INTERAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS INDEPENDENTES SOBRE A ATIVIDADE DE (HEMI)CELULASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus niger* NRRL 326



FONTE: A Autora (2017).

LEGENDA: (A) – Efeito da interação entre a proporção de palma e concentração total de nitrogênio sobre a atividade de CMCCase.

(B) – Efeito da interação entre a proporção de palma suspensa e a proporção de fontes de nitrogênio sobre a atividade de CMCCase.

(C) – Efeito da interação entre a concentração total de nitrogênio e a proporção de suas fontes sobre a atividade de CMCCase.

(D) – Efeito da interação entre a concentração total de nitrogênio e a proporção de suas fontes sobre a atividade de xilanase

Na FIGURA 5-4(A) observa-se uma interação sinérgica entre a proporção de palma suspensa e a concentração total de nitrogênio. Não fica bem definida a área ótima total das condições de obtenção das maiores atividades enzimáticas, mas é possível notar que estão na combinação de proporções de palma acima de 1% (m/v) e concentração de nitrogênio acima de 0,6 g/L, região em que está predita uma atividade maior que 6 U/mL de CMCCase. Na FIGURA 5-4(B) a região ótima está mais bem definida, pode ser visto que em concentrações muito baixas de ureia e

muito altas de sulfato de amônio. Mesmo com quantidade mais elevada de palma, a atividade de CMCase é reduzida, sendo predita abaixo de 4 U/mL, da mesma forma, para uma baixa proporção de palma combinada com valores muito altos de ureia e baixos de amônio são previstos valores em torno de zero para a atividade. Possivelmente, isso se dá pelo fato de o micro-organismo não ter uma fonte de nitrogênio de mais fácil assimilação no meio, o que pode diminuir sua atividade metabólica. Os testes anteriores com fontes de nitrogênio já haviam mostrado que a ureia não é uma fonte de nitrogênio viável para a produção da endoglucanase (TABELA 5-13).

A FIGURA 5-4(C) mostra que proporções equilibradas entre o sulfato de amônio e a ureia, em conjunto com maiores concentrações de nitrogênio são responsáveis por maiores valores de atividade endocelulolítica. Comportamento semelhante foi obtido para tal interação na produção de xilanase (FIGURA 5-4(D)).

Da mesma forma que para as superfícies obtidas para as atividades enzimáticas do *Aspergillus* sp., as curvas da FIGURA 5-4 deram origem a modelos matemáticos representativos da produção de enzimas por *Aspergillus niger* NRRL 326. Esses modelos estão dispostos nas Equações 5-2 (CMCase) e 5-3 (xilanase):

$$z = 0,554 + 3,956x - 3,733x^2 + 5,175y - 10,364y^2 + 4,228 * 0,6555x + 7,752xy - 9,916 * 0,6555y + 2,921 \quad (5-2)$$

Em que x é a proporção de palma, y é a proporção de ureia no meio e z é a atividade de CMCase (fixado 0,6555 g/L de nitrogênio).

$$z = 26,530 + 5,022x - 39,344x^2 + 24,723y - 10,887y^2 + 155,357 * 0,5x + 113,386xy - 174,949 * 0,5y + 3,361 \quad (5-3)$$

Em que x é a proporção de palma, y é a concentração de nitrogênio no meio e z é a atividade de xilanase (fixado 50% de ureia e 50% de sulfato de amônio).

O R² do modelo representado na Equação (5-2) foi de 0,97, sendo o R² ajustado 0,93. Já para o modelo descrito em (5-3), o R² foi de 0,92, sendo ajustado 0,84. Os valores foram determinados para 95% de confiança.

O modelo foi validado utilizando condições indicadas na área de ótima atividade (1,25% de palma e 0,656 g/L de nitrogênio oriundo 50% da ureia e 50% do sulfato de amônio) e forneceu uma resposta de 7,143 U/mL para CMCase e 118,887 U/mL para xilanase. Os testes de repetição obtiveram $5,618 \pm 0,185$ U/mL para CMCase e $130,565$ U/mL para xilanase. Essa condição permitiu ainda encontrar atividades de $1,726 \pm 0,17$ U/mL para FPase e $0,57 \pm 0,02$ U/mL para mananase.

Os dados obtidos na produção de enzimas pelas duas cepas indicaram que ambas necessitam de maiores proporções de palma suspensa no meio. Algumas interações entre as variáveis independentes também se mostraram significativas para a produção das (hemi)celulases. Com base nos resultados, foram escolhidas condições de produção para cada micro-organismo, e estas estão dispostas na TABELA 5-16.

TABELA 5-16 – CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA A PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO E ATIVIDADES OBTIDAS

| | | Condições otimizadas | |
|-------------------------------|--|------------------------|--------------------------------------|
| | | <i>Aspergillus sp.</i> | <i>Aspergillus niger</i> NRRL 326 |
| Meio de cultivo para produção | Proporção de palma em suspensão (%) | 2 | 1,5 |
| | Concentração de nitrogênio (g/L) | 0,874 | 0,656 |
| | Proporção das fontes | 50:50 | 75:25 |
| | Relação carbono/nitrogênio | 2,75 | 2,75 |
| Atividades | Celulase (U/mL) | 5,442 | 2,041 |
| | Endoglucanase (U/mL) | 17,635 | 6,427 |
| | Xilanase (U/mL) | 108,881 | 134,131 |
| | Mananase (U/mL) | 0,496 | 0,261 |

FONTE: A autora (2017)

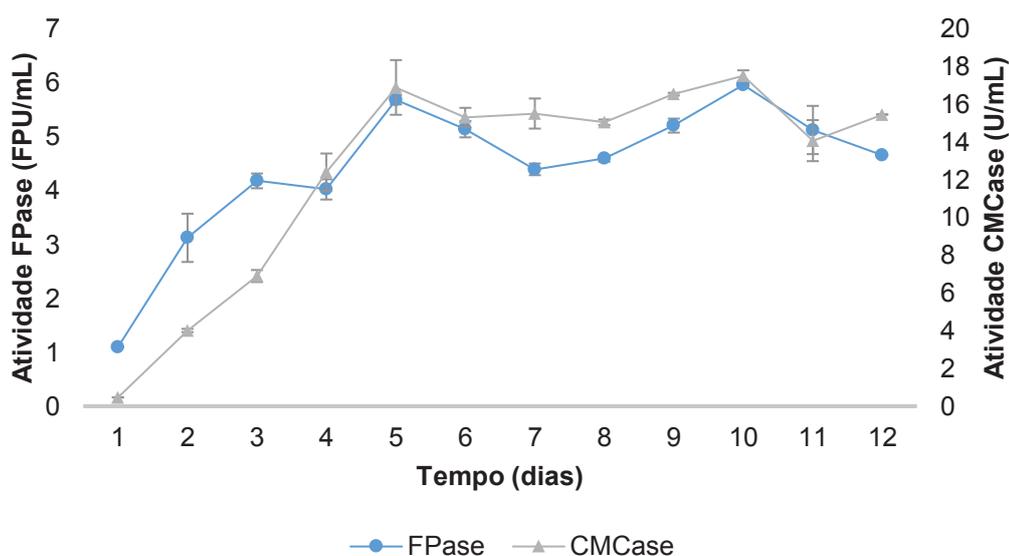
As diferentes condições dos ensaios realizados levam a uma composição também variável no quesito relação carbono/nitrogênio. As condições iniciais

mostraram uma relação C/N de 2,56, inferior àquela obtida no meio otimizado (2,75). Com uma maior relação carbono/nitrogênio o micro-organismo apresenta maior taxa de crescimento, e conseqüentemente, maior formação de biomassa e maior a produção das enzimas. Coincidentemente, os dois micro-organismos mostraram a mesma relação C/N, apesar de estarem em condições diferentes. A determinação dessa relação pode auxiliar no estudo de experimentos posteriores utilizando o mesmo substrato e fontes de nitrogênio.

5.3.7. Estudo cinético de produção de complexo (hemi)celulolítico por *Aspergillus* sp.

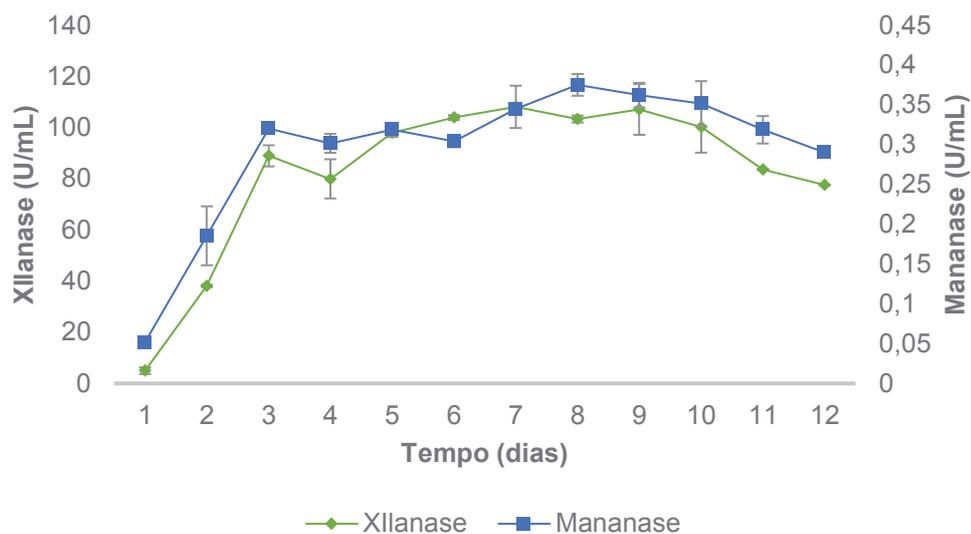
Escolhidas as condições do processo fermentativo, foi realizado o estudo da evolução da produção das enzimas estudadas com o tempo. Para o *Aspergillus* sp. as condições seguiram em 2% de palma suspensa e 0,874 g/L de nitrogênio, sendo 50% oriundo da ureia e 50% do sulfato de amônio. As FIGURAS 5-5 e 5-6 mostram os gráficos das atividades das celulasas (FPase e CMCase) e hemicelulasas (xilanasase e mananase), respectivamente, ao curso de 12 dias.

FIGURA 5-5. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Aspergillus* sp.



FONTE: A autora (2017)

FIGURA 5-6. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE HEMICELULASES POR *Aspergillus* sp.



FONTE: A autora (2017)

Como pode ser visto na FIGURA 5-5, as celulases apresentaram dois picos de atividade, em 5 e 10 dias, com atividades de $5,686 \pm 0,087$ U/mL e $5,962 \pm 0,014$ U/mL para FPase, respectivamente e $16,900 \pm 1,450$ U/mL e $17,515 \pm 0,290$ U/mL para CMCase. Considerando o tempo de processo, pode-se deduzir que cinco dias (120 h) é o tempo ideal para produção das celulases por *Aspergillus* sp. nas condições de fermentação escolhidas. As produtividades nos tempos de pico foram de $1,13$ U/mL·dia e $0,59$ U/mL·dia para FPase e $3,37$ U/mL·dia e $1,75$ U/mL·dia para CMCase.

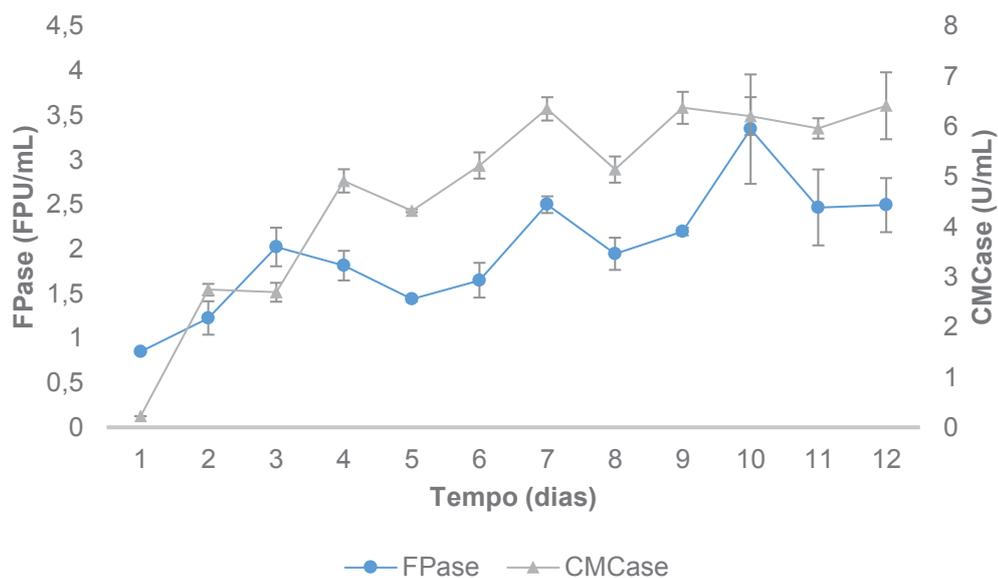
Na FIGURA 5-6 pode ser observado que, para xilanase, houve uma estabilidade na produção entre 5 e 10 dias, com atividades entre $97,923 \pm 1,591$ U/mL (5 dias) e $108 \pm 8,257$ U/mL (7 dias), sendo que a melhor produtividade nesse período foi obtida em 5 dias, com $19,584$ U/mL·dia. Para a mananase a maior atividade se deu em 8 dias, ($0,375 \pm 0,013$ U/mL) e a maior produtividade em 3 dias com $0,107$ U/mL·dia.

Considerando o tempo ideal de produção das quatro enzimas, o processo mostrou-se viável em até cinco dias de fermentação, período no qual foram obtidas atividades mais altas para todas as enzimas estudadas sendo maior produtividade para CMCase, FPase e Xilanase.

5.3.8. Estudo cinético de produção de complexo (hemi)celulolítico por *Aspergillus niger* NRRL 326

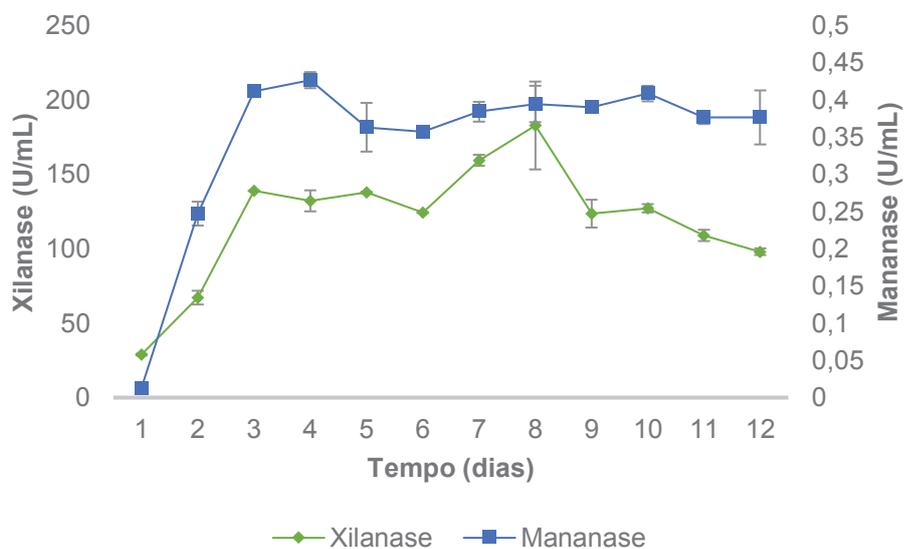
No que diz respeito ao *Aspergillus niger*, as curvas de produção estão dispostas nos gráficos das FIGURAS 5-7 e 5-8:

FIGURA 5-7. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Aspergillus niger* NRRL 326.



FONTE: A autora (2017)

FIGURA 5-8. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE HEMICELULASES POR *Aspergillus niger* NRRL 326



FONTE: A autora (2017)

A FPase de *Aspergillus niger* mostrou pico em 7 dias, com $3,344 \pm 0,613$ U/mL, com picos de produtividade em 1 e 3 dias, com 0,849 e 0,674 U/mL.dia, sendo a relação produção *versus* produtividade melhor no dia 3, em que houve atividade de $2,023 \pm 0,216$ U/mL. A CMCase teve pico de atividade em 7 dias, com $6,349 \pm 0,232$ U/mL e produtividade de 0,907 U/mL.dia. A maior produtividade foi obtida em 4 dias com 1,22 U/mL.dia.

No que diz respeito às hemicelulases, a xilanase apresentou pico no dia 8, com $182,79 \pm 29,497$ U/mL. Contudo, houve um elevado desvio-padrão, com erro de 16%, o que indica proximidade com o valor obtido no dia anterior ($159,407 \pm 2,681$ U/mL). A maior produtividade, entretanto, foi obtida no dia 3, com $138,865 \pm 4,596$ U/mL e 46,288 U/mL.dia. Para a mananase, as melhores produções se deram entre os dias 3 e 4 com $0,411 \pm 0,007$ U/mL e $0,426 \pm 0,011$ U/mL, sendo então a melhor produtividade detectada também no dia 3, com 0,137 U/mL.dia.

Zhao e colaboradores (2018) utilizaram farelo de arroz e palha de milho para produzir celulasas e xilanases em estado semissólido, embora utilizando maiores concentrações do resíduo (3%) e com uma mistura de inóculos de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* e obtiveram um perfil de produção de enzimas similar ao encontrado no presente estudo, com melhor produção de de celulasas (tanto em termos de FPase quanto em termos de endoglucanases) em cinco dias, e de xilanases em 4 dias. A atividade de FPase obtida por eles no quinto dia foi de 3,63 U/mL para a palha de milho e 2,56 U/mL para o farelo de arroz, valor similar ao encontrado neste trabalho. Já os valores de xilanase obtidos pelos autores foram inferiores aos encontrados neste estudo (56,82 e 45,94 U/mL). As xilanases no presente estudo também foram expressas em atividade mais alta relativamente mais cedo que as celulasas, o que o autor justifica com o fato de as xilanas estarem mais acessíveis aos micro-organismos do que as glucanas.

O mesmo padrão de comportamento foi encontrado por Menegol e colaboradores (2016), com maior produção de celulasas e endoglucanase em cinco dias e xilanase em 4 dias, produzindo as enzimas a partir de *Penicillium echinulatum* utilizando capim-elefante como substrato. Porém as atividades obtidas por estes autores foram muito inferiores às encontradas neste trabalho, com Fpase de 0,28 U/mL, CMCase de 1,5 U/mL e xilanase de 1,5 U/mL utilizando resíduo tratado

quimicamente.

Olajuyibe e Ogunyewo (2016) encontraram melhor produção de endoglucanases em 4 dias, utilizando espiga de milho como substrato e *Sporothrix carnis* como produtor, com atividade de 285,7 U/mL, muito superior ao que foi encontrado nesse estudo, e com menor tempo de produção; entretanto, após cinco dias de fermentação a atividade enzimática cai drasticamente, destoando do que foi encontrado nesse trabalho.

É possível ver nos gráficos a diferença de escala entre os valores das atividades, sendo a atividade de xilanase muito maior do que a de mananase. Essa diferença de escala se dá, principalmente, porque a composição da hemicelulose do resíduo é majormente de xilana, com prováveis ramificações de glucanas e mananas. Assim sendo, degradando, materiais diferentes, e em diferentes escalas, elas ainda assim apresentam o mesmo perfil cinético, com pico no terceiro dia e produção estável ao longo dos demais dias de fermentação. É razoável propor que esse padrão esteja relacionado às semelhanças entre os mecanismos de ação dessas proteínas, ou ao fato de elas pertencerem ao mesmo grupo de classificação.

Um perfil semelhante ao encontrado nesse estudo foi descrito por Liao e colaboradores (2015), que produziram xilanases múltiplas utilizando *Penicillium oxalicum*. Os autores também identificaram uma produção elevada no terceiro dia de fermentação e a manutenção desse valor de atividade nos dias subsequentes, até sete dias de fermentação.

5.3.9. Viabilidade celular do *Aspergillus* sp.

Após os testes de cinética, foi escolhido o *Aspergillus* sp. para os próximos experimentos, uma vez que ele possui maior produção de celulasas e se mostrou tão bom quanto o *Aspergillus niger* NRRL 326 na produção de xilanases. Foi feito um estudo da viabilidade celular do *Aspergillus* sp. para verificar com quanto tempo de crescimento o inóculo poderia ser aplicado na fermentação. Esse teste permitiu ver que, a partir de 3 dias de inóculo, já havia uma formação expressiva do número de colônias nas placas utilizadas no teste. O teste de viabilidade mostrou que, em 4 dias de inoculação, foram obtidas $92,99 \pm 3,38\%$ das colônias esperadas na

inoculação. A partir desse dia, a viabilidade não foi reduzida, mantendo valores entre 90 e 110% até o oitavo dia.

5.3.10. Produção em biorreatores utilizando a cepa selecionada *Aspergillus* sp.

Foi realizado um teste para avaliar como a produção do complexo enzimático se daria em um biorreator tipo coluna de bolhas com *Aspergillus* sp., com volume total de 1,5 L, do qual 0,5 L foi deixado como *headspace*. As condições de fermentação foram aquelas definidas na otimização, com 2% (m/v) de palma, 0,874 g/L de nitrogênio, sendo 50% proveniente da ureia e 50% do sulfato de amônio. Os resultados obtidos estão dispostos na TABELA 5-17:

TABELA 5-17 – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS NA FERMENTAÇÃO EM FRASCOS DE ERLLENMEYER E BIORREATOR TIPO COLUNA DE BOLHAS COM A CEPA *Aspergillus* sp.

| Reator | FPase (U/mL) | CMCase (U/mL) | Xilanase (U/mL) | Mananase (U/mL) |
|------------------|--------------|---------------|-----------------|-----------------|
| Erlenmeyer | 8,322±0,118 | 25,431±0,580 | 77,6448±3,895 | 0,479±0,028 |
| Coluna de bolhas | 9,953±0,616 | 28,969±0,072 | 73,279±0,120 | 0,486±0,025 |

FONTE: A autora (2017)

A partir dos dados da TABELA 5-17, pode-se observar que as atividades foram mantidas quando submetidas à aeração forçada, ou ainda aumentaram no caso das FPase e da endoglucanase. As demais não apresentaram diferença significativa. Desse modo, é possível verificar que a produção das enzimas pode se dar no biorreator sem perdas. É sabido que, biorreatores pneumáticos, como o coluna de bolhas, são adequados para a bioprocessos catalisados por fungos filamentosos, uma vez que apresentam menor efeito de cisalhamento sobre a formação dos micélios do que os biorreatores agitados mecanicamente (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2017; DORAN, 2012; SCHMIDELL; FACCIOTI, 2001).

Maceno e colaboradores (2016) ao contrário do encontrado nesse estudo,

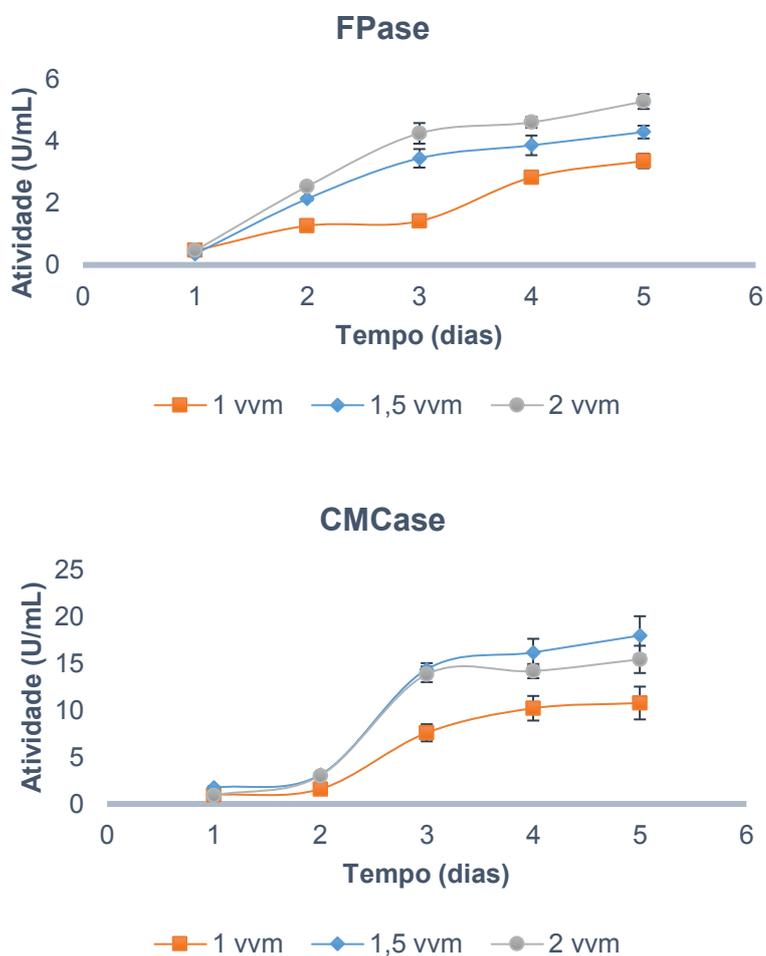
observaram que a produção em biorreatores de coluna de bolhas (atividade enzimática de 0,012 U/mL) se mostrou ineficiente quando comparada àquela em frascos de Erlenmeyer (0,334 U/mL), o que pode ser devido ao tipo de micro-organismo aplicado, o basidiomiceto *Phanerochaete*, cuja estrutura micelial é diferente da estrutura do ascomiceto aplicado nesse estudo e, possivelmente, mais sensível ao cisalhamento.

A produção de biomoléculas por fungos filamentosos em biorreatores tipo coluna de bolhas já se mostrou satisfatória, como no trabalho de Rasoulnia e Mousavi (2016) que utilizaram um reator tipo coluna de bolhas em leito fluidizado para produzir ácidos orgânicos por *Aspergillus niger*. Libardi e colaboradores (2017) também foram bem sucedidos em produzir celulases por *Trichoderma harzianum* em biorreator coluna de bolhas em leito fluidizado.

5.3.11. Estudo da Influência da aeração sobre a produção de enzimas em biorreator tipo coluna de bolhas por *Aspergillus* sp.

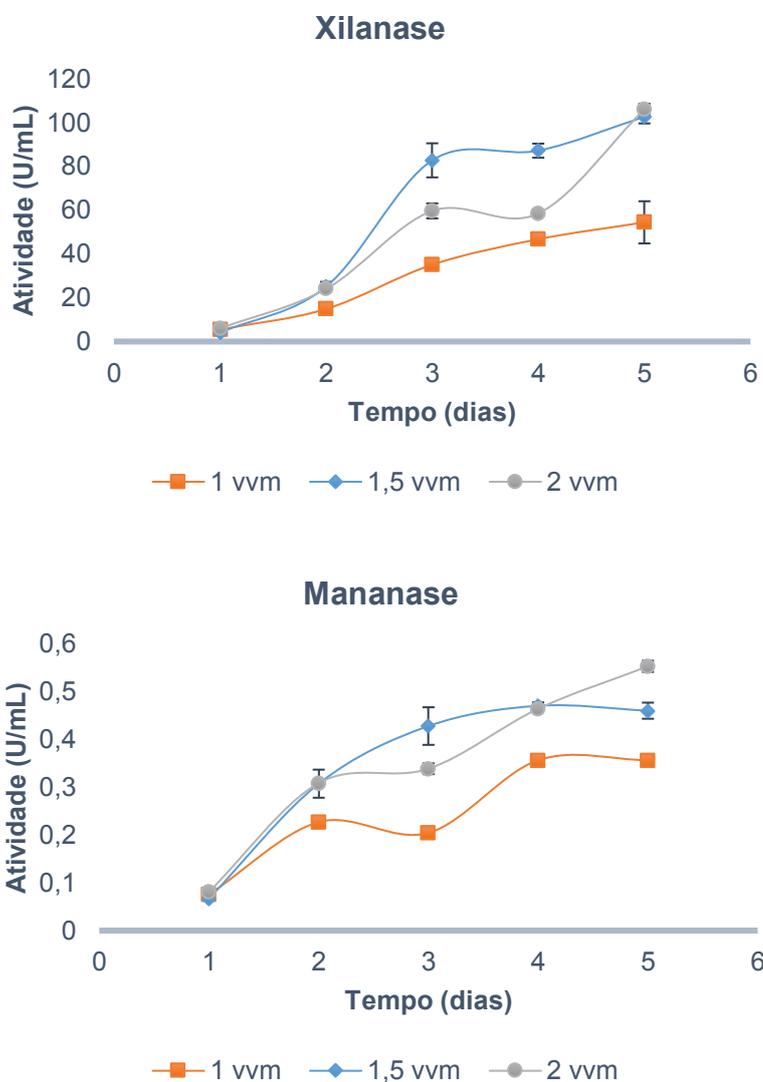
Foi analisada a produção das enzimas com o passar do tempo, nos biorreatores de coluna de bolhas em diferentes condições de aeração. Os gráficos nas FIGURAS 5-9 e 5-10 mostram o perfil de produção enzimática obtido:

FIGURA 5-9. – PERFIL DE PRODUÇÃO DE CELULASES EM BIORREATOR TIPO COLUNA DE BOLHAS COM O PASSAR DO TEMPO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE AERAÇÃO



FONTE: A autora (2018)

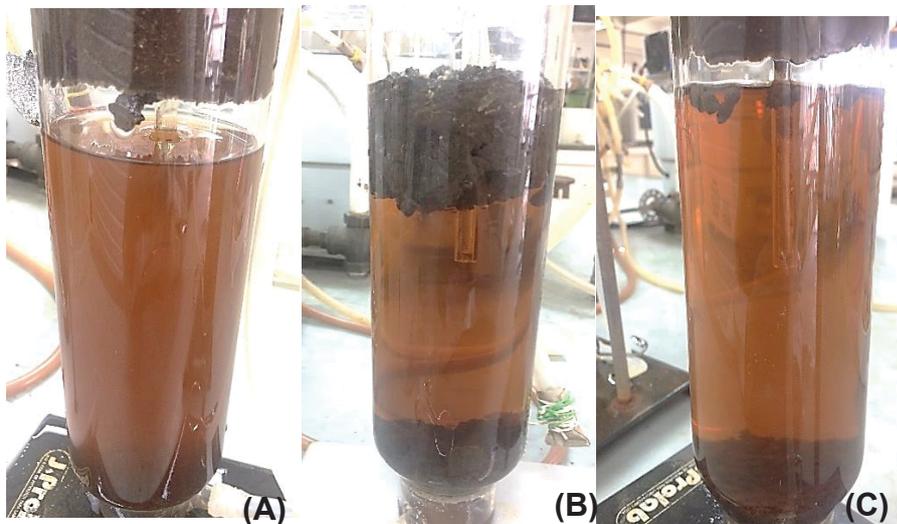
FIGURA 5-10 – PERFIL DE PRODUÇÃO DE HEMICELULASES EM BIORREATOR TIPO COLUNA DE BOLHAS COM O PASSAR DO TEMPO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE AERAÇÃO



FONTE: A autora (2018)

Os gráficos mostram que a aeração favoreceu a produção das enzimas em todos os casos, estando a curva de produção em 1 vvm sempre abaixo das demais. Maiores taxas de aeração, com conseqüente maior difusão de oxigênio para as células, sendo o *Aspergillus* sp. um micro-organismo aeróbio, seu crescimento é induzido, promovendo, assim, maior produção das enzimas. A aeração também foi primordial num segundo fator do processo fermentativo: o caldo fermentado produzido sob maiores aerações apresentou menor turbidez, sendo clarificado na própria fermentação, como mostra a FIGURA 5-11:

FIGURA 5-11 – MEIOS DE FERMENTAÇÃO OBSERVADOS NOS BIORREATORES DE COLUNA DE BOLHAS APÓS CINCO DIAS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE AERAÇÃO



FONTE: A autora (2018)

LEGENDA: Reatores coluna de bolhas após cinco dias de fermentação em diferentes aerações:

(A) – 1,0 vvm;

(B) – 1,5 vvm;

(C) – 2,0 vvm.

Como pode ser visto na FIGURA 5-11, a partir de 1,5 vvm, o meio fermentado apresenta-se mais clarificado, sendo após a fermentação filtrado à vácuo em papel de filtro. Antes das etapas de micro e ultrafiltração o fermentado seria submetido à centrifugação para remoção das partículas suspensas que podem causar entupimentos nas membranas; contudo, para os meios que apresentam a característica de maior clarificação, esta etapa pode ser dispensada.

O efeito da aeração sobre a produção de biomoléculas por fungos filamentosos tem sido estudado por outros pesquisadores, tanto em biorreatores tipo coluna de bolhas quanto em tipo tanque agitado. Singh, Chauhan e Pandey (2019) produziram inulinase utilizando cultivo de *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 em biorreator tipo tanque agitado, utilizando aerações entre 0,65 e 1,35 vvm. Os autores observaram que a melhor produção de inulinase se deu com aeração intermediária, próximo a 1 vvm, com redução significativa redução de produção sob maiores aerações. A diferença em relação ao presente estudo pode ser explicada pelo fato de que os autores aplicaram agitação mecânica em associação à aeração, de modo

que o micélio do fungo já estava susceptível ao rompimento, o que pode ser amplificado por valores altos de aeração.

5.4. CONCLUSÃO

Avaliando os resultados obtidos neste trabalho, é possível afirmar que os cachos vazios dos frutos de palma representam um substrato promissor para a produção das enzimas, sendo possível agregar valor a um resíduo agroindustrial produzido em grande volume. Também é notória a capacidade adaptativa do micro-organismo escolhido para a produção das enzimas, havendo a possibilidade de realizar o cultivo em reatores de diversas configurações obtendo boa produção das enzimas-alvo. Os dados de atividade enzimática e tempo de produção corroboram com os dados encontrados na literatura e são perfeitamente aplicáveis para o bioprocessamento em várias escalas.

O resíduo atua como ótimo provedor de carbono, suporte e microelementos para o micro-organismo. A otimização do bioprocessamento de produção foi estatisticamente consistente, mostrando a confiabilidade dos dados obtidos e seu potencial para execução rotineira sem grandes variabilidades.

Por fim, o estudo levou à determinação de condições ótimas para o desenvolvimento de um processo de produção de enzimas com potencial para integração em um sistema *on-site* de produção e aplicação das enzimas em resíduos lignocelulósicos oriundos da indústria de palma oleaginosa.

6. CARACTERIZAÇÃO, SEPARAÇÃO, PURIFICAÇÃO E FORMULAÇÃO DE PRODUTO ENZIMÁTICO (HEMI)CELULOLÍTICO

6.1. INTRODUÇÃO

O processo de aplicação das enzimas demanda um produto com relativo grau de pureza, longa vida de prateleira e com condições factíveis de serem alcançadas industrialmente. Para isso, um extrato enzimático produzido por via microbiana precisa passar por uma série de etapas de *downstream* (CONNER et al., 2014). A realização das etapas de clarificação e concentração são essenciais no estabelecimento de um produto enzimático desse tipo, uma vez que removem a biomassa, impurezas e potenciais componentes inibidores presentes no extrato enzimático (de CARVALHO et al., 2017). Ademais, baixas concentrações proteicas num extrato enzimático favorecem a desestabilização de tais proteínas, podendo causar perda da atividade biológica (SIMPSON, R. J., 2010).

Usualmente, esses processos se dão através de filtrações, que podem ser feitas utilizando membranas de filtração tangencial, sistemas também normalmente utilizados a nível industrial. Esse tipo de processo é preferido em relação às filtrações convencionais por resultar em menores entupimentos das membranas, uma vez que o fluxo de material permeia a superfície das membranas de forma paralela (MERCK-MILLIPORE, 2003; de CARVALHO et al., 2017).

Ainda que o extrato concentrado tenha grande potencial de aplicação, é necessário determinar condições em que ele permaneça estável por mais tempo, para que possa ser armazenado e tenha um bom tempo de vida de prateleira, característica essencial para um produto competitivo. Essas condições são atingidas a partir da utilização de aditivos que impedem contaminações microbianas e estabilizam a estrutura proteica, impedindo ou retardando sua desnaturação com o tempo. A estabilização de uma estrutura proteica em solução depende de vários fatores, tais como pH, força iônica, temperatura e a presença dos estabilizantes mencionados (SINGH et al., 2009; CROMELLIN, 2013).

Esse desenvolvimento do produto é regulamentado por órgãos governamentais, que determinam as características que deve apresentar o produto

enzimático, tais como seu grau de pureza, ausência de toxinas, quantidades de aditivos utilizados na formulação, entre outros. No Brasil, essa regulamentação é realizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, que, nas resoluções de diretoria RDC 53 E 54, de 2014, informa como se deve proceder no desenvolvimento e aplicação de um produto enzimático em alimentos (BRASIL, 2014a,b).

O processo de hidrólise conduzido por essas enzimas é dependente de suas características ótimas de aplicação, tais como temperatura e pH em que ela atua com sua máxima atividade, influência de inibidores potencialmente presentes em meios ou aditivos e suas características cinéticas e termodinâmicas. É essencial conhecer os parâmetros de ação das enzimas que serão utilizadas para que o processo seja realizado nas melhores condições possíveis.

Assim sendo, esse trabalho teve como objetivo avaliar as condições de elaboração de um concentrado celulolítico e hemicelulolítico com potencial para aplicação na produção de hidrolisados de biomassa lignocelulósica, além de avaliar suas características ótimas de aplicação e verificar seu comportamento cinético e termodinâmico.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

Em todos os testes realizados, foram avaliadas as atividades de FPase, endoglucanase, xilanase e mananase. Para os procedimentos de *downstream* foram quantificadas as proteínas totais. Todos as análises foram executadas conforme descrito nos itens a seguir:

6.2.1. Atividade de FPase (FPase)

Para determinação da atividade de celulase com ação sobre o papel de filtro, foi utilizada metodologia descrita por Ghose (1987) modificada (SIQUEIRA et al., 2020b). De forma que 41 μ L de extrato enzimático foram adicionados a 82 μ L de

tampão citrato 0,05 M pH 4,8. A mistura foi agitada e temperada a 50°C. Adicionou-se, então uma fita de papel de filtro Whatman nº1 de 4,1 mg (0,5 cm x 1 cm). O sistema foi incubado a 50°C por 1 h. A quantificação dos açúcares redutores foi feita reagindo a mistura hidrolisada com 245 µL de reativo de DNS em banho em ebulição por 5 minutos. A reação foi parada em banho de gelo também por 5 minutos. Foi adicionado 1,63 mL de água e feita a leitura a 540 nm.

6.2.2. Atividade de endoglucanase (CMCase)

Para determinação da atividade de celulase com ação sobre carboximetilcelulose (CMC), foi utilizada metodologia descrita por Ghose (1987) modificada (SIQUEIRA et al., 2020b). De forma que 42 µL de extrato enzimático foram adicionados a 42 µL de CMC 2% (m/v) em tampão citrato 0,05 M pH 4,8. O sistema foi incubado a 50°C por 30 minutos. A quantificação dos açúcares redutores foi feita reagindo a mistura hidrolisada com 250 µL de reativo de DNS em banho em ebulição por 5 minutos. A reação foi parada em banho de gelo também por 5 minutos. Foi adicionado 1,67 mL de água e feita a leitura a 540 nm.

6.2.3. Atividade de xilanase

Para determinação da atividade de xilanase, foi utilizada metodologia descrita por Bailey, Biely e Poutanen (1992) modificada. De forma que 20 µL de extrato enzimático foram adicionados a 180 µL de xilana beechwood 1% em tampão citrato 0,05 M pH 5,3. A quantificação dos açúcares redutores foi feita reagindo a mistura hidrolisada com 300 µL de reativo de DNS em banho em ebulição por 5 minutos. A reação foi parada em banho de gelo também por 5 minutos. Foi feita a leitura a 540 nm.

6.2.4. Atividade de mananase

Para determinação da atividade de mananase, foi utilizada metodologia descrita por Rättö e Poutanen (1988). Assim sendo, 500 μ L de extrato enzimático foram adicionados a 500 μ L de *locust bean gum* (LBG) em tampão citrato 0,05 M pH 5,3. A quantificação dos açúcares redutores foi feita reagindo a mistura hidrolisada com 1 mL de reativo de DNS em banho em ebulição por 5 minutos. A reação foi parada em banho de gelo também por 5 minutos. Adicionou-se 5 mL de água deionizada e feita a leitura a 540 nm.

6.2.5. Determinação da concentração de proteínas

A quantificação das proteínas solúveis totais foi feita a partir do método de Bradford (1976), no qual 50 μ L de amostra reagem com 1,5 mL de reativo de Bradford e a mistura era agitada em agitador de tubos tipo vórtex e lida a 595 nm.

6.2.6. Caracterização bioquímica das enzimas

Os procedimentos a seguir foram realizados com o intuito de avaliar as condições ótimas de atuação das enzimas estudadas, bem como determinar suas características frente a potenciais situações de exposição química e física, bem como seu comportamento energético.

6.2.6.1. *Determinação do perfil de temperatura de aplicação das enzimas*

Para verificação da melhor temperatura de execução da hidrólise enzimática, as atividades foram realizadas conforme descrito nos itens 6.2.1., 6.2.2, 6.2.3 e 6.2.4, porém em temperaturas distintas, num intervalo de 20 a 80°C. O teste foi aplicado nos quatro procedimentos de quantificação de atividade (FPase, endoglucanases, xilanase e mananase). Os resultados foram expressos em

atividade relativa, estabelecendo uma razão entre a atividade enzimática obtida nas reações conduzidas nas temperaturas citadas e a atividade enzimática no ponto de maior atividade.

6.2.6.2. *Determinação do perfil de pH de atuação das enzimas*

Para verificação do melhor pH de execução da hidrólise enzimática, as atividades foram realizadas conforme descrito nos itens 6.2.1, 6.2.2, 6.2.3, e 6.2.4, porém em pH's distintos, num intervalo de pH 3 a pH 10. Para tal, foram utilizados tampões nos pH's mencionados (TABELA 6-1) para preparo dos substratos e ambientação das enzimas. Os resultados foram expressos em atividade relativa, estabelecendo uma razão entre a atividade enzimática obtida nos pH's citados e a atividade enzimática no ponto de maior atividade.

TABELA 6-1 – TAMPÕES EMPREGADOS NOS TESTES DE DETERMINAÇÃO DE pH ÓTIMO DAS ENZIMAS

| pH | Tampões |
|------|--------------|
| 3-7 | Citrato |
| 8 | Fosfato |
| 9-10 | Glicina-NaOH |

FONTE: A autora (2018)

6.2.6.3. *Influência de íons e açúcares sobre a atividade enzimática*

Foram testadas soluções iônicas e moleculares na concentração de 10 mM para avaliar se possuíam ação inibidora ou indutora da atividade enzimática. Foram utilizados CaCl₂, MgSO₄, BaCl₂, CoCl₂, NaCl, KCl, FeSO₄, ZnSO₄, glicose, celobiose, lactose e EDTA escolhidos a partir de listas de potenciais inibidores ou ativadores de atividade (hemi)celulolítica presentes na literatura (PEREIRA et al., 2017; VASCONCELLOS et al., 2016). Os resultados foram expressos em atividade relativa, estabelecendo uma razão entre a atividade enzimática obtida nas condições citadas e a atividade enzimática do extrato bruto.

6.2.6.4. Determinação de parâmetros cinéticos

A avaliação da velocidade de reação enzimática foi mensurada a partir de ensaios de atividade realizados utilizando substratos em diferentes concentrações. Como em concentrações mais baixas do substrato a velocidade aumenta linearmente até certo ponto; e a partir daí aumenta mais lentamente até que seja insignificante a diferença, é possível determinar a velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) nesta região. $V_{m\acute{a}x}$ é atingida quando não houver enzima livre, ou seja, quando toda sua carga proteica estiver ligada ao substrato (NELSON; COX, 2014).

As concentrações dos substratos utilizadas no teste dos quatro ensaios enzimáticos, estão apresentadas na TABELA 6-2:

TABELA 6-2 – CONCENTRAÇÕES DOS SUBSTRATOS UTILIZADOS NOS QUATRO ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

| Atividade Substrato | FPase Papel filtro (mg/mL) | CMCase Carboximetilcelulose (%) | Xilanase Xilana (%) | Mananase Goma de alfarroba (%) |
|---------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| Concentrações | 5,00 | 0,10 | 0,025 | 0,01 |
| | 15,00 | 0,25 | 0,05 | 0,025 |
| | 20,00 | 0,50 | 0,10 | 0,05 |
| | 25,00 | 0,75 | 0,25 | 0,10 |
| | 33,33 | 1,00 | 0,50 | 0,25 |
| | 66,00 | 1,50 | 0,75 | 0,40 |
| | 100,00 | 2,00 | 1,00 | 1,00 |
| | 150,00 | 2,50 | 1,50 | 1,50 |
| | | 3,00 | 2,00 | 2,00 |

FONTE: A autora (2018)

A determinação das constantes de cinética foi feita pela linearização da curva de Michaelis e Menten, plotando-se um gráfico duplo recíproco, com o inverso da atividade enzimática obtida em função do inverso da concentração de substrato, ajuste denominado linearização de Lineweaver-Burk. Essa curva tem uma inclinação de $K_m/V_{m\acute{a}x}$ e uma interseção de $1/V_{m\acute{a}x}$ no eixo y (Equação 6-1) (NELSON; COX, 2014).

$$y = \left(\frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \right) x + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (6-1)$$

Em que $y = \frac{1}{\text{Atividade enzim\acute{a}tica}}$ e $x = \frac{1}{[\text{substrato}]}$.

6.2.6.5. Energia de Ativação

O cálculo da energia de ativação, energia mínima necessária para que ocorra a reação, foi feito com base na curva de temperatura ótima das enzimas, utilizando uma linearização da equação de Arrhenius (ARRHENIUS, 1889) da fração inicial da curva, desde o primeiro ponto até o ponto máximo. De acordo com Arrhenius, o comportamento da velocidade de reação segue a equação (6-2):

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad (6-2)$$

Que pode ser linearizada utilizando o logaritmo neperiano, assumindo a forma:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (6-3)$$

Em que k é a constante de velocidade, A é um fator de frequência de colisões, R é a constante dos gases (8,314 J/Kmol), T é a temperatura em Kelvin e E_a é a energia de ativação da reação. A plotagem da curva linearizada leva à reta cuja inclinação é igual a $-E_a/R$ e cuja intersecção com o eixo y é o $\ln A$.

6.2.6.6. Estabilidade à temperatura

Para a avaliação do comportamento das enzimas em termos energéticos foram utilizados os dados da caracterização de temperatura ótima e de testes de estabilidade térmica, nos quais o extrato enzimático foi submetido a temperaturas diferentes por um determinado período, de modo a avaliar o decréscimo de sua atividade. Foram realizados testes de estabilidade nas temperaturas de 50, 60, 70 e

80°C para as atividades de celulasas, endoglucanase, xilanase e mananase. Amostras do extrato eram coletadas a cada 10 minutos para análise, durante uma hora.

De posse desses dados, foi possível determinar a constante e energia de inativação térmica, tempo de meia vida e a entalpia, entropia e energia livre de Gibbs do processo de inativação da atividade enzimática. Os cálculos dos parâmetros foram feitos como segue.

6.2.6.7. *Constante e energia de inativação térmica*

A constante de inativação térmica foi determinada a partir do coeficiente angular das curvas formadas pelas atividades enzimáticas ao longo do tempo de exposição a cada uma das temperaturas testadas.

A energia de inativação foi calculada plotando-se uma curva do logaritmo neperiano das constantes de desativação em função do inverso da temperatura aplicada (em Kelvin), sendo mais uma vez aplicada uma linearização da equação de Arrhenius. Da mesma forma, o coeficiente angular da reta foi utilizado para cálculo da energia de inativação (PORTO et al., 2006).

6.2.6.8. *Tempo de meia vida*

O tempo de meia vida, definido como o tempo em que a atividade biológica da enzima cai pela metade, foi calculado para as quatro classes de enzimas, nas quatro temperaturas aplicadas, através da equação 6-4:

$$t_{1/2} = \ln 2 / K_d \quad (6-4)$$

Conforme descrito por Rashid e Siddiqui (1998).

6.2.6.9. Parâmetros termodinâmicos de inativação

A variação de entalpia para inativação térmica caracteriza o número de ligações não covalentes quebradas durante a reação, enquanto a variação de entropia representa a desordem associada à mudança do estado livre para o estado complexado ao substrato (ORTEGA et al, 2004). Tais parâmetros são calculados a partir da equação de Eyring (6-5), da sua teoria de transição de estado (EYRING, 1935):

$$\ln \left(\frac{k_d h}{k_B T} \right) = - \frac{\Delta H^*}{RT} + \frac{\Delta S^*}{R} \quad (6-5)$$

Em que K_d é a constante de desativação térmica nas temperaturas avaliadas, h é a constante de Planck ($6,62607 \cdot 10^{-34} \text{ m}^2 \cdot \text{kg/s}$), K_B é a constante de Boltzmann ($1,38065 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \cdot \text{kg/s}^2 \cdot \text{K}$), R é a constante dos gases, ΔH^* é a entalpia de inativação, ΔS^* é a entropia gerada pela inativação e T é a temperatura de estudo. Da mesma forma realizada anteriormente, é calculado o \ln do primeiro termo da equação e plotado em função de $1/T$. Dessa forma, o coeficiente angular da equação é relacionado à ΔH^* e o coeficiente linear à ΔS^* . O cálculo de ΔG^* foi então feito a partir da relação mostrada na equação 6-6:

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T \Delta S^* \quad (6-6)$$

6.2.7. Separação e clarificação do extrato enzimático

A remoção de componentes indesejáveis do extrato enzimático bruto é essencial para a aplicação posterior da enzima. Para tal, foram utilizados sistemas de separação por membranas de micro e ultrafiltração. O sistema também foi utilizado na concentração das proteínas para obtenção de um produto com menor teor de contaminantes e concentrado para ser usado em testes de formulação e caracterização. Todo o extrato utilizado nos testes de filtração foi previamente filtrado em papel filtro para separação da biomassa.

6.2.7.1. *Definição de estratégia de separação e concentração de enzimas*

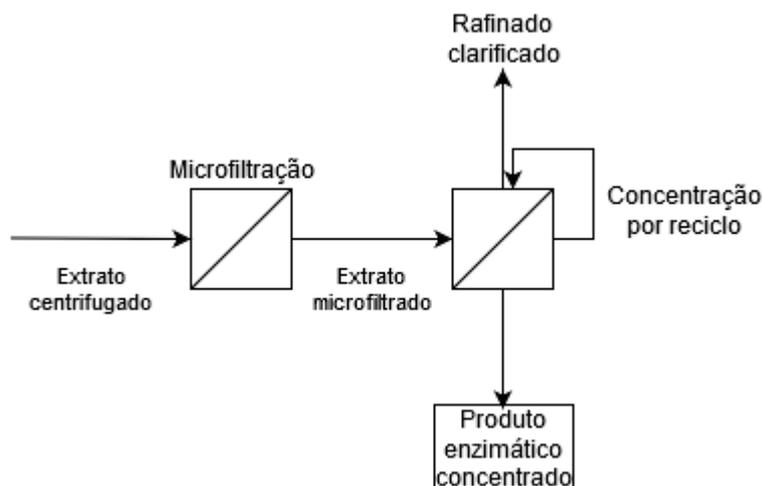
Inicialmente, foi aplicado um teste de determinação de *cut-off* de membrana para determinar o tamanho dos poros das membranas a serem utilizadas posteriormente. Para tal, foi utilizado sistema *Vivaflow*® da Sartorius. O teste abrangeu os tamanhos de poro de 100 KDa, 50 KDa e 30 KDa. Após as filtrações foram mensuradas as atividades enzimáticas dos retidos e permeados. Foi também quantificada a concentração de proteínas totais (como descrito no item 6.2.5) em cada uma das fases, para determinar a atividade específica delas, estabelecida pela razão entre a atividade enzimática e as proteínas totais, e que determina quantas unidades de atividade estão presentes por miligrama de proteínas.

Com as atividades específicas é possível, então, calcular o fator de pureza da fração avaliada, dividindo sua atividade específica pela atividade específica do extrato bruto (POLETTO et al., 2015) e, conseqüentemente, verificando se as proteínas presentes na fase são correspondentes apenas às hidrolases de interesse ou se há a presença de outras proteínas, como havia anteriormente no extrato.

6.2.7.2. *Filtração e concentração em membranas de fluxo tangencial*

O extrato bruto foi submetido à microfiltração em membrana de 0,2 µm e ultrafiltração sequencial em membrana de 30 KDa. Para concentração da proteína alvo, o extrato foi recirculado nesta última etapa (FIGURA 6-1). As mesmas mensurações realizadas anteriormente foram aplicadas nessa etapa.

FIGURA 6-1– ESQUEMA DO PROCEDIMENTO DE CLARIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO POR SISTEMA DE FILTRAÇÃO TANGENCIAL



FONTE: A autora (2019)

Para avaliar a eficiência do processo de concentração, foi determinada mais uma vez a atividade específica nas frações para cálculo da purificação. Em consonância, foi calculada a recuperação das enzimas, definida pela relação entre as atividades enzimáticas obtidas no concentrado e no extrato bruto, multiplicada pela razão entre seus volumes.

6.2.8. Formulação do produto enzimático

Os testes iniciais de formulação foram realizados de acordo com resultados positivos obtidos previamente no grupo de pesquisa (GOELZER, 2015; MONTIBELLER, 2015; LIBARDI, 2018), com aditivos e suas concentrações permitidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2014a,b), a saber: ácido benzoico (0,05%), benzoato de sódio (0,25%), cloreto de sódio (0,5%), manitol (5%) e sorbitol (3 M).

No procedimento, os aditivos foram solubilizados no extrato enzimático previamente clarificado e concentrado. A solução foi fracionada em várias alíquotas que foram submetidas a estresse térmico (50°C), num teste de estabilidade acelerada. Eram coletadas alíquotas a cada três dias, num período de 15 dias e

avaliadas as atividades enzimáticas, para avaliação da influência dos aditivos na manutenção das atividades.

Numa segunda etapa de estudos, foi realizado um planejamento fatorial tipo DCCR, combinando as concentrações dos dois aditivos que mostraram melhor ação sobre a preservação da atividade enzimática no produto formulado. Para tal, novamente foi empregada a técnica da estabilidade acelerada.

Finalmente, a formulação líquida foi desenvolvida a partir dos parâmetros definidos no planejamento. O produto foi então mantido em temperatura ambiente e sob refrigeração, sendo então a atividade enzimática mensurada a cada 30 dias.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

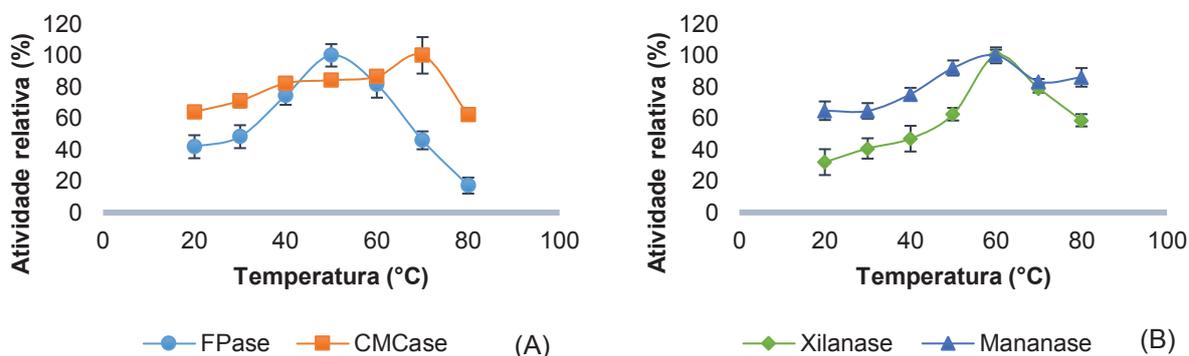
6.3.1. Caracterização das enzimas

Os tópicos a seguir abordam a caracterização bioquímica das enzimas, considerando suas condições de operação como temperatura, pH, presença de íons inibidores e comportamento cinético e termodinâmico.

6.3.1.1. *Determinação do perfil de temperatura*

Os resultados obtidos para a temperatura ótima de hidrólise enzimática estão apresentados na FIGURA 6-2:

FIGURA 6-2–PERFIL DAS TEMPERATURAS DE ATIVIDADE DAS (HEMI)CELULASES DE *Aspergillus* sp.



FONTE: A autora (2018)

Na FIGURA 6-2 (A) é possível ver que a FPase apresentou maior atividade na reação realizada a 50°C, com um pico isolado, sendo que a partir de 70°C, a atividade relativa já era inferior à 40°C. A CMCase teve pico de atividade a 70°C, embora, considerando o desvio-padrão, o valor detectado ($27,48 \pm 3,19$ U/mL) não se distancia muito daqueles obtidos a 50°C ($23,13 \pm 0,36$ U/mL) e 60°C ($23,77 \pm 0,49$ U/mL), de modo que a enzima aparenta certa estabilidade no que concerne à temperatura de hidrólise utilizada no processo de aplicação. No intervalo de 40 a 60°C, a atividade relativa de endoglucanases permaneceu superior a 80%.

No que concerne às hemicelulases (FIGURA 6-2 (B)), tanto a xilanase quanto a mananase tiveram temperatura ótima em 60°C. Essa variação entre as atividades ótimas pode ser positiva quando for desejável aplicar uma das classes de enzimas em detrimento das demais. Se o objetivo for a utilização do complexo como um todo, o ideal é que seja aplicada a temperatura de 50°C, uma vez que as FPase apresentaram decréscimo de atividade em temperaturas mais altas. A temperatura de aplicação será, então, dependente do processo. Deve-se lembrar, também que o protocolo de atividade de FPase é aplicado por 1 hora (GHOSE, 1987), sendo que nesse tempo pode ser causada a desnaturação das proteínas em temperaturas mais altas, daí a importância de estudar a estabilidade dessas proteínas à altas temperaturas. O processo de aplicação deve então ser desenvolvido com análise cuidadosa da temperatura utilizada e do tempo de processo.

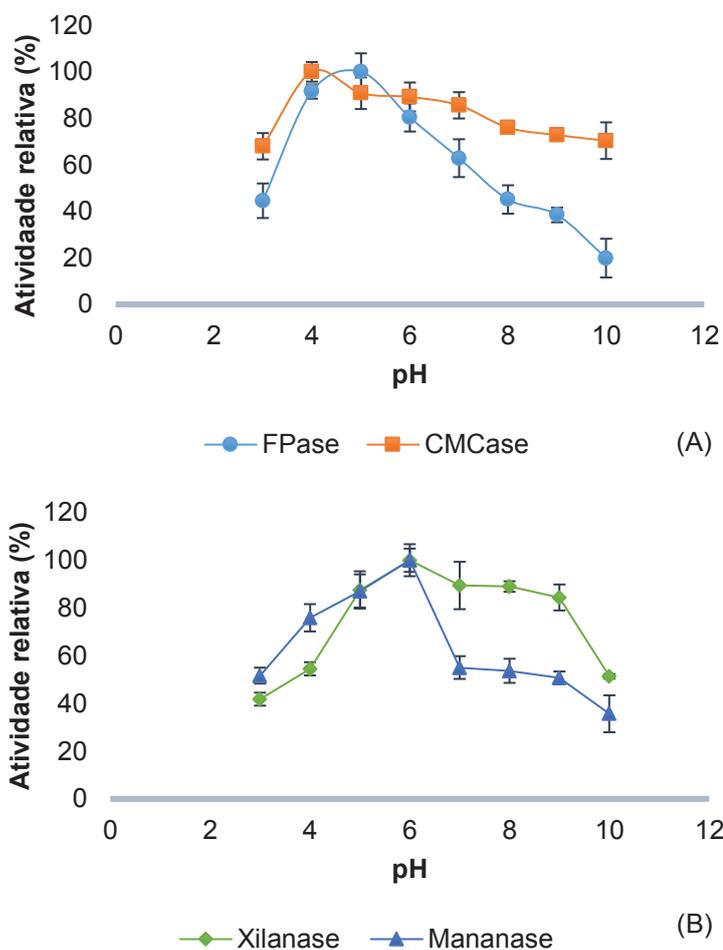
Os resultados obtidos são consistentes com fichas técnicas de complexos enzimáticos comercializados atualmente (NOVOZYMES, 2013) e com dados da literatura, mesmo quando as enzimas são produzidas por micro-organismos muito diferentes daqueles aplicados nesse estudo, tais como o *Botryosphaeria* sp. e *Saccharicola* sp. utilizados por Marques e colaboradores (2018), cuja endoglucanase mostrou temperatura ótima em 60°C, bem como sua xilanase. Kupsi e colaboradores (2014) encontraram resultados similares também para produção de FPase e endoglucanases, com temperatura ótima de 60°C, produzidas tanto por *Rhizopus oryzae* quando por *Trichoderma reesei*. Produzindo hemicelulases de *Ceriporiopsis subvermispota*, Heidorne e colaboradores (2006) também observaram temperatura ótima de 60°C para mananase e xilanase.

Rawat e colaboradores (2014) encontraram perfil semelhante de aplicação de celulase total para *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus oryzae*, com 55°C de temperatura ótima para os dois primeiros e 50°C para o terceiro. Também, como encontrado neste estudo, os autores perceberam que, a 60°C, ainda havia atividade residual, com maior decréscimo a partir dos 70 e 80°C.

6.3.1.2. Determinação do perfil de pH

A FIGURA 6-3 apresenta a atuação das (hemi)celulases produzidas em diferentes pH's.

FIGURA 6-3. PERFIL DE pH DE REAÇÃO DAS (HEMI)CELULASES DE *Aspergillus* sp.



FONTE: A autora (2018)

É possível identificar nos gráficos que para as FPase o melhor pH foi de 5 e para a endoglucanase a melhor condição foi a de pH 4, mas no pH 5, ainda é mantida 90,8% da atividade. Já para as hemicelulases, o pH 6 apresentou a maior atividade. Pôde ser observado que o pH é um fator de grande importância no processo hidrolítico, tendo uma faixa muito específica de trabalho para todas as enzimas estudadas, sendo a endoglucanase a única que apresentou maior estabilidade. Dessa forma, é necessário também que o processo de aplicação seja muito bem estudado e os parâmetros definidos de acordo com o produto de interesse na hidrólise; mas é visível que, se o interesse for a aplicação simultânea das enzimas, o melhor pH de aplicação é 5.

Quanto ao pH ótimo, também foram identificados na literatura resultados consistentes com aqueles encontrados neste estudo. Ajjolakewu e colaboradores (2017) obtiveram pH ótimo para xilanase entre 4,5 e 5,3, apresentando característica um pouco mais ácida do que aquela encontrada neste trabalho (pH ótimo em 6, com mais de 80% de atividade residual tanto em 4 quanto em 6). Marques e colaboradores (2018), entretanto, encontraram resultado semelhante ao presente, para xilanase, com pH ótimo de 5,5. Contudo, sua endoglucanase se apresentou mais afim ao meio um pouco mais próximo da neutralidade (pH 6), enquanto a presente mostrou afinidade ao meio um pouco mais ácido (pH 4). A xilanase produzida por Thomas, Parameswaran e Pandey (2016) utilizando *Aspergillus* sp. apresentou maior sensibilidade a variações de pH do que as encontradas no presente estudo, sendo que naquela dos autores, em pH 8 há um decréscimo grande da atividade, enquanto a presente mostra decaimento apenas em pH 10. Para as celulases, Kupsi e colaboradores (2014) encontraram pH ótimo entre 4 e 5, tanto para endoglucanase quanto para FPase, tal como encontrado neste trabalho.

6.3.1.3. *Influência de íons e açúcares sobre a atividade enzimática*

Dos compostos analisados, foi identificado que a atividade de FPase foi fortemente inibida pela presença de ferro (37,13%), celobiose (44,43%) e EDTA (27,61%), estando esses componentes na concentração de 10 mM. Os demais compostos não causaram inibição da atividade e nenhum deles apresentou indução. A TABELA 6-3 apresenta as atividades relativas de cada um dos ensaios feitos com os diferentes íons e açúcares.

TABELA 6-3–ATIVIDADES RELATIVAS DAS (HEMI)CELULASES DE *Aspergillus* sp. QUANDO SOB INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE ÍONS, AÇÚCARES E SAL QUELANTE

| Íon/molécula | FPase (%) | CMCase (%) | Xilanase (%) | Mananase (%) |
|------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Ca ²⁺ | 89,84 ± 4,29 | 95,56 ± 1,94 | 90,68 ± 2,69 | 108,38 ± 3,18 |
| Mg ²⁺ | 83,497 ± 1,14 | 99,87 ± 9,76 | 97,44 ± 3,23 | 103,81 ± 0,44 |
| Ba ²⁺ | 83,815 ± 9,46 | 97,99 ± 3,62 | 108,62 ± 3,44 | 115,25 ± 1,43 |
| Co ²⁺ | 95,24 ± 5,50 | 118,50 ± 4,80 | 99,77 ± 0,35 | 119,98 ± 6,72 |
| Cu ⁺ | 95,557 ± 6,78 | 102,80 ± 1,37 | 86,37 ± 3,27 | 119,52 ± 2,11 |
| Na ⁺ | 83,815 ± 3,65 | 96,51 ± 2,57 | 91,14 ± 4,69 | 109,91 ± 7,47 |
| K ⁺ | 88,258 ± 7,47 | 95,02 ± 4,49 | 99,77 ± 6,11 | 95,12 ± 2,68 |
| Fe ²⁺ | 62,869 ± 4,62 | 97,92 ± 5,18 | 93,47 ± 1,87 | 111,44 ± 1,03 |
| Zn ⁺ | 94,28 ± 5,56 | 97,38 ± 3,82 | 91,03 ± 0,39 | 91,31 ± 1,45 |
| Glicose | 83,18 ± 10,38 | 83,53 ± 2,91 | 131,23 ± 2,97 | 91,76 ± 10,23 |
| Celobiose | 55,57 ± 8,62 | 115,04 ± 2,42 | 132,86 ± 2,27 | 97,41 ± 2,86 |
| Lactose | 86,353 ± 6,70 | 108,44 ± 5,43 | 130,18 ± 1,61 | 92,83 ± 0,49 |
| EDTA | 72,390 ± 9,87 | 91,52 ± 5,79 | 89,28 ± 4,90 | 86,27 ± 0,61 |

FONTE: A autora (2018)

LEGENDA: Em vermelho: inibição; em verde: indução.

Para a endoglucanase, foi detectada indução pela adição de cobalto (118,50% de atividade relativa) e celobiose (115,04%). Já para a atividade de xilanase, houve indução quando da reação com os açúcares, com cerca de 130% de atividade relativa nos ensaios de glicose, celobiose e lactose. A mananase também apresentou apenas indução, porém esta ocorreu pela ação dos íons metálicos bário (115,25%) cobre (119,52% de atividade relativa), cobalto (119,98%).

Em potencial aplicação das enzimas obtidas nesse processo, poderia ser interessante adicionar cobalto como indutor, uma vez que ele aumentou a atividade da endoglucanase e da mananase e manteve as demais enzimas atuando da com sua efetividade inicial. O mesmo se aplica ao cobre, que induziu a atividade de mananase sem inibir as demais enzimas. Os demais íons que apresentaram influência sobre esta última, causaram inibição na atividade de FPase. O uso de açúcares, apesar de ter induzido a atividade de xilanase, inibiu a FPase, provavelmente, uma inibição pela concentração dos produtos (glicose e celobiose).

Vasconcellos e colaboradores (2016), pesquisando a influência de íons metálicos sobre a atividade de endoglucanase e xilanase produzidas por *Aspergillus niger*, encontraram resultados um pouco diversos dos apresentados neste estudo, com influência negativa dos íons cobre e ferro, além de também a atividade ter sido

reduzida na presença de EDTA. Houve, entretanto, semelhança no fato da indução por cobalto. Sobre a xilanase, para as enzimas dos autores, foi negativa a influência da adição de íons metálicos, mostrando uma enzima mais sensível a variações potenciais no seu meio de aplicação.

6.3.2. Caracterização cinética e termodinâmica

Os parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$) e termodinâmicos (Energia de ativação, constante de inativação térmica, energia, entalpia e entropia de inativação, tempo de meia-vida e energia livre de Gibbs) determinados para as (hemi)celulases produzidas por *Aspergillus* sp. estão dispostos na TABELA 6-4.

TABELA 6-4–PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS CALCULADOS PARA AS (HEMI)CELULASES DE *Aspergillus* sp.

| | Fpase | CMCase | Xilanase | Mananase |
|---------------------------------|---------|---------|----------|----------|
| K_m (mg/mL) | 0,02 | 0,48 | 0,74 | 0,80 |
| $V_{máx}$ (U/mL) | 7,14 | 18,62 | 61,73 | 0,34 |
| E_a (kJ/mol) | 23,88 | 7,37 | 22,06 | 8,28 |
| K_d 80°C (min ⁻¹) | 0,48 | 0,02 | 0,04 | 0,04 |
| K_d 70°C (min ⁻¹) | 0,03 | 0,02 | 0,04 | 0,04 |
| K_d 60°C (min ⁻¹) | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,03 |
| K_d 50°C (min ⁻¹) | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,004 |
| E_d (kJ/mol) | 50,11 | 35,54 | 31,6 | 69,46 |
| $T_{1/2}$ (80°C) (min) | 18,43 | 34,66 | 15,54 | 19,15 |
| $T_{1/2}$ (70°C) (min) | 20,15 | 31,94 | 15,97 | 18,94 |
| $T_{1/2}$ (60°C) (min) | 30,94 | 43,05 | 28,88 | 25,02 |
| $T_{1/2}$ (50°C) (min) | 91,20 | 93,67 | 44,15 | 192,54 |
| ΔH_i (kJ/mol) | 47,3 | 28,79 | 32,73 | 66,66 |
| ΔS_i (J/K·mol) | -171,81 | -229,62 | -212,46 | -115,57 |
| ΔG (50°C) (KJ/mol) | 102,82 | 102,99 | 101,39 | 104,01 |
| ΔG (60°C) (KJ/mol) | 104,54 | 105,29 | 103,51 | 105,16 |
| ΔG (70°C) (KJ/mol) | 106,26 | 107,59 | 105,64 | 106,32 |
| ΔG (80°C) (KJ/mol) | 107,98 | 109,88 | 107,76 | 107,47 |

FONTE: A autora (2018)

LEGENDA: K_m – constante de Michaelis-Menten;

$V_{máx}$ – velocidade máxima de reação;

E_a – Energia de ativação;

K_d – constante de inativação térmica;

E_d – energia de inativação;

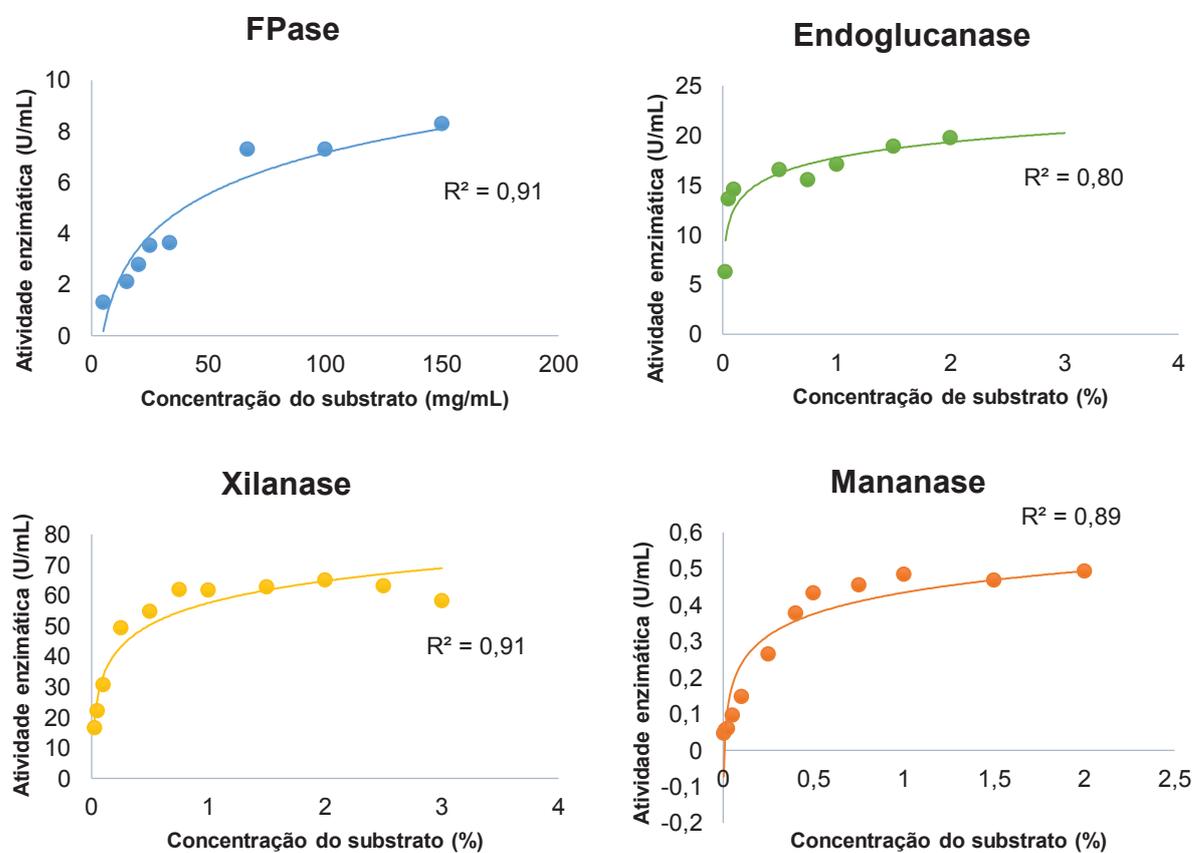
$T_{1/2}$ – tempo de meia-vida;
 ΔH_i – entalpia de inativação;
 ΔS_i – entropia de inativação;
 ΔG – energia livre de Gibbs.

Os itens a seguir apresentam a análise e discussão dos dados contidos na TABELA 6-4.

6.3.2.1. Cinética enzimática

As curvas obtidas na análise de cinética estão apresentadas na FIGURA 6-4:

FIGURA 6-4 – PERFIL CINÉTICO DAS (HEMI)CELULASES DE *Aspergillus* sp.



FONTE: A autora (2018)

É possível ver na FIGURA que as atividades mensuradas possuem perfil similar ao descrito por Michaelis e Menten (JOHNSON; GOODY, 2011). Para determinação da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e constante de Michaelis (K_m), foi feita uma linearização de Lineweaver-Burk, e tais resultados estão descritos na TABELA 6-4:

O K_m define a afinidade que existe entre a enzima e o substrato, sendo inversamente proporcional à esta. O valor de K_m obtido para a endoglucanase se assemelha, em termos de ordem de grandeza, ao obtido por Kupski e colaboradores (2014) para endoglucanase produzida por *Trichoderma reesei*, que pela linearização de Lineweaver-Burk, obteve K_m de 0,20 mg/mL. Para a xilanase, o K_m encontrado também é semelhante ao encontrado por Liao e colaboradores (2015), para xilanase produzida por *Penicillium oxalicum*, que foi de 1,0 mg/mL, quando utilizado a xilana de madeira de faia (beechwood), como a que foi utilizada no presente estudo, de modo que o encontrado neste trabalho mostra que a enzima produzida pelo *Aspergillus* sp., isolado da palma, apresenta maior afinidade com a xilana da madeira de faia do que o *Penicillium oxalicum*.

6.3.2.2. Energia de ativação

A energia de ativação das FPase foi de 23,88 kJ/mol, para a endoglucanase, 7,37 kJ/mol; para a xilanase 22,06 kJ/mol; e para a mananase 8,28 kJ/mol. A energia de ativação auxilia na observação da quantidade de energia que será aplicada para iniciar a catálise enzimática, de modo que quanto menor for esse fator, menos energia será gasta no processo.

6.3.2.3. Estabilidade à temperatura

No que diz respeito à atividade enzimática após a exposição do extrato a altas temperaturas, foi observado que as temperaturas de 70 e 80°C se mostraram mais danosas para as quatro classes de enzimas, enquanto que a 50°C, foi possível manter a atividade mais estável, sendo que a mananase foi a que se mostrou mais

estável entre todas. Os dados obtidos foram então utilizados para determinar as constantes de inativação térmica.

6.3.2.4. Constante e energia de inativação térmica

As constantes de inativação térmica estão dispostas na TABELA 6-4, e a partir delas foram obtidas as energias de inativação para cada uma das enzimas, e estas foram 50,11 kJ/mol para as FPase, 35,54 kJ/mol para a endoglucanase, 31,60 kJ/mol para a xilanase e 69,46 kJ/mol para a mananase. Os resultados das celulases foram relativamente superiores aos obtidos por Kupski e colaboradores (2014), que foram de 17,7 kJ/mol para endoglucanases e 16,3 kJ/mol para FPase; ambas produzidas por *Rhizopus oryzae*. No que se refere às celulases produzidas por *Trichoderma reesei*, os valores se assemelham mais, mas são menores que o encontrado pelos autores para endoglucanase (66,3 kJ/mol) e maiores para as FPase (35,4 kJ/mol). Desse modo, as FPase do *Aspergillus* sp. do presente estudo apresentam maior resistência à maiores temperaturas, uma vez que requerem mais energia para sua inativação térmica.

6.3.2.5. Tempo de meia vida

A TABELA 6-5 apresenta os dados de tempo de meia vida para as temperaturas analisadas:

TABELA 6-5. TEMPOS DE MEIA VIDA DAS (HEMI)CELULASES ENTRE 50 E 80°C

| Temperatura (°C) | Tempo de meia vida (min) | | | |
|------------------|--------------------------|---------------|----------|----------|
| | FPase | Endoglucanase | Xilanase | Mananase |
| 80 | 18,435 | 34,657 | 15,541 | 19,148 |
| 70 | 20,150 | 31,942 | 15,971 | 18,938 |
| 60 | 30,944 | 43,053 | 28,881 | 25,023 |
| 50 | 91,204 | 93,668 | 44,150 | 192,541 |

FONTE: A autora (2018)

Quanto ao tempo de meia-vida, é possível ver na TABELA 6-5 o aumento da manutenção da atividade enzimática à medida que a temperatura de exposição é reduzida, conforme esperado. Para a endoglucanase e para a mananase o tempo de meia vida aparece inferior em 70°C em relação a 80°C; a diferença, porém, é muito pequena. Da mesma forma para as demais enzimas, é pequena a diferença entre os tempos para as duas temperaturas.

Em termos práticos, vê-se que é possível manter a atividade enzimática mesmo que a enzima esteja exposta à alta temperatura no intervalo de tempo calculado. De modo que, o complexo enzimático estando em temperatura de 50°C, por exemplo, é possível obter enzima ainda ativa em até 91,2 minutos para FPase, 93,7 minutos para CMCase, 44,15 minutos para xilanase e 192,5 minutos para mananase.

6.3.2.6. *Parâmetros termodinâmicos de inativação*

A entalpia de inativação foi determinada para as quatro enzimas, chegando aos valores de 47,30 kJ/mol para as FPase, 28,79 kJ/mol para a endoglucanase, 32,73 kJ/mol para a xilanase e 66,67 kJ/mol para a mananase. Já os valores de entropia foram de -171,81 J/K.mol para as FPase, -229,62 J/K.mol para a endoglucanase, -212,46 J/K.mol para a xilanase e -115,57 J/K.mol. Os valores de entalpia obtidos são maiores que aqueles obtidos por Kupski et al (2014), que permaneceram em torno de 13 a 15 kJ/mol, mas são ainda inferiores ou estão dentro do intervalo considerado para serem características de uma desnaturação reversível, sendo necessário que haja maior energia para que a desnaturação seja irreversível (PORTO et al., 2006).

Os valores de entropia abaixo de zero indicam uma organização do sistema reacional, o que pode ser devido a um aumento de rigidez estrutural do complexo enzima-substrato, em detrimento ao comportamento dos dois componentes em separado (PORTO et al., 2006). Da mesma forma, vários autores encontraram esse padrão para diversas enzimas (PORTO et al., 2006; KUPSKI et al., 2014; DALAGNOL et al., 2017).

Os valores de entropia negativos contribuíram para uma energia livre de Gibbs mais elevada, como demonstrado na TABELA 6-4. Os valores, mais uma vez, se assemelham às celulasas e endoglucanase de Kupski e colaboradores (2014). Conectado a não geração de desordem no universo reacional indicada pela entropia negativa, a energia livre de Gibbs em valores elevados indica uma estabilidade considerável das enzimas a temperaturas elevadas. Valores baixos desse parâmetro seriam indicativos de desnaturação térmica irreversível. As observações a respeito da energia livre de Gibbs são um parâmetro de alta confiabilidade quando se fala da estabilidade de uma enzima em reação (SAQIB et al, 2010; KUPSKI et al, 2014). Deve-se também lembrar que a energia de Gibbs positiva indica que o processo não é espontâneo, de modo que para que haja a inativação térmica é, naturalmente, necessário fornecer uma alta quantidade de energia.

6.3.3. Separação e purificação das enzimas produzidas

Os tópicos a seguir abordam os mecanismos utilizados para realização do *downstream* das enzimas produzidas, tendo como objetivo recuperar e purificar o produto, além de prepará-lo para estudos de formulação.

6.3.3.1. *Definição de estratégia de separação e concentração das (hemi)celulasas de Aspergillus sp.*

O teste inicial utilizando as membranas de filtração tangencial mostraram que todas as enzimas ficaram retidas antes da membrana de 30 KDa. Os dados de atividade obtida estão dispostos na TABELA 6-6:

TABELA 6-6– ATIVIDADE ESPECÍFICA DAS FRAÇÕES RETIDAS E FILTRADAS EM CADA UMA DAS MEMBRANAS

| | Fpase (U/mg) | CMCase (U/mg) | Xilanase (U/mg) | Mananase (U/mg) |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Inicial | 8,09 | 41,01 | 97,02 | 1,85 |
| Retido (200 µm) | 6,01 | 7,91 | 69,74 | 0,67 |
| Permeado (200 µm) | 13,79 | 88,84 | 188,69 | 1,86 |
| Retido (100 KDa) | 40,45 | 105,43 | 464,48 | 7,87 |
| Permeado (100 KDa) | 78,96 | 451,65 | 1000,89 | 9,29 |
| Retido (50 KDa) | 96,35 | 368,68 | 1112,61 | 9,35 |
| Permeado (50 KDa) | 295,14 | 980,91 | 2228,43 | 13,09 |
| Retido (30 KDa) | 1508,98 | 6197,86 | 26193,88 | 157,57 |
| Permeado (30 KDa) | 63,77 | 278,98 | 1039,68 | 1,04 |

FONTE: A autora (2018)

As atividades específicas, descritas na TABELA 6-6, mostram a distribuição das enzimas em relação às proteínas totais em cada uma das frações, retida e permeada. A atividade específica do material retido na membrana de microfiltração (6,01 U/mg de FPase, 7,91 U/mg de CMCase, 69,74 U/mg de xilanase e 0,67 U/mg de mananase), abaixo de todas as outras frações, mostra que, nessa fração, houve uma retenção maior das proteínas que não faziam parte do complexo alvo. As atividades específicas obtidas nas frações retida de 30 KDa e permeada de 50 KDa são maiores que as demais, o que indica que nessas parcelas do material há uma maior concentração de enzimas em relação à quantidade total de proteínas, de modo que apresentam maior pureza que as demais. Pode-se, então, inferir que as enzimas apresentam tamanho entre 30 e 50 KDa.

O sistema de filtração com corte de 30 KDa já se mostrou eficiente para outras carbohidrases, tais como a xilanase β -xilosidase de *Aspergillus niger*, purificada por Boyce e Walsh (2018). Porém, é possível que a utilização de membranas de 10 KDa como feito por Maitan-Alfenas e colaboradores (2015) traga ainda menos perdas. Entretanto, como foi possível ver das perdas correntes de atividade no processo, a maioria dessas proteínas possui mais de 30 KDa, e uma carga muito elevada delas pode causar obstrução dos poros de 10KDa, dificultando a filtração.

6.3.3.2. Concentração da enzima em membranas de fluxo tangencial

A concentração realizada utilizando a microfiltração seguida da ultrafiltração em membrana de 30 KDa mostrou-se eficiente, como mostram os dados da TABELA 6-7:

TABELA 6-7–EFICIÊNCIA DE CONCENTRAÇÃO UTILIZANDO MEMBRANA DE 30 KDa

| | Recuperação (%) | Purificação (adm) |
|-----------------|-----------------|-------------------|
| FPase | 85,004 | 5,883 |
| CMCase | 103,187 | 7,142 |
| Xilanase | 100,558 | 6,960 |
| Mananase | 111,474 | 7,715 |

FONTE: A autora (2018)

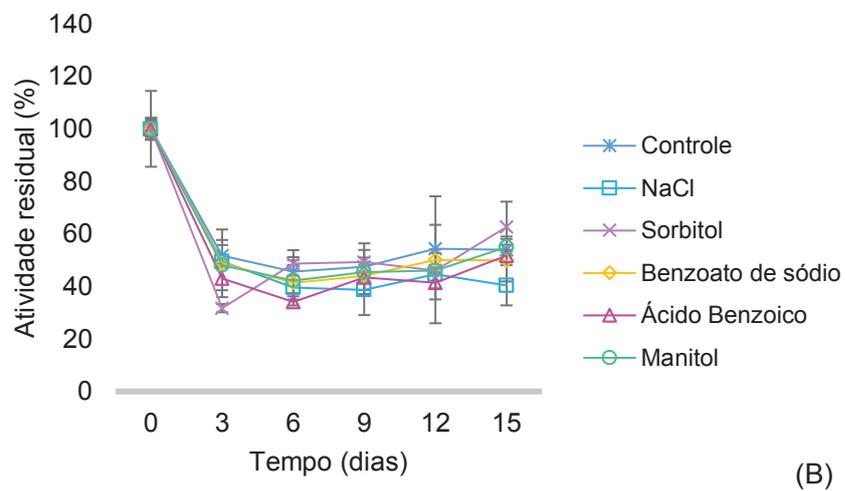
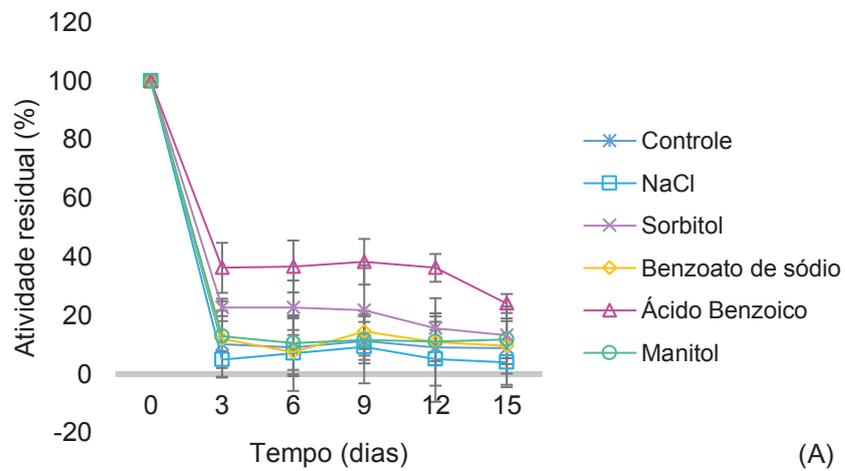
Em termos de volume, o extrato foi concentrado cinco vezes. Na TABELA 6-7 é possível ver a recuperação das enzimas após a concentração. Foi possível recuperar completamente CMCase, xilanase e mananase. Apenas a FPase teve sua atividade diminuída, o que provavelmente se dá devido às perdas ocasionadas no processo e a potencial eliminação de substâncias que reduzam a efetividade da ação enzimática, pode haver variação para mais ou para menos (DOBLE, 2016; FLASCHEL; WANDERY; KULA, 1983).

A única enzima que mostrou perda no processo de concentração foram as FPase, sendo também a que mostrou menor grau de purificação no concentrado. Tendo como referências a FPase, o aumento de pureza foi de quase seis vezes, e ainda maior tendo como referência as demais enzimas. Considerando os dados positivos obtidos, decidiu-se manter a membrana de 30 KDa para as posteriores concentrações do extrato enzimático.

6.3.4. Formulação do produto enzimático

Os resultados dos testes de estabilidade a estresse térmico (50°C) estão apresentados nos gráficos da FIGURA 6-5 para as celulasas e na FIGURA 6-6 para as hemicelulasas:

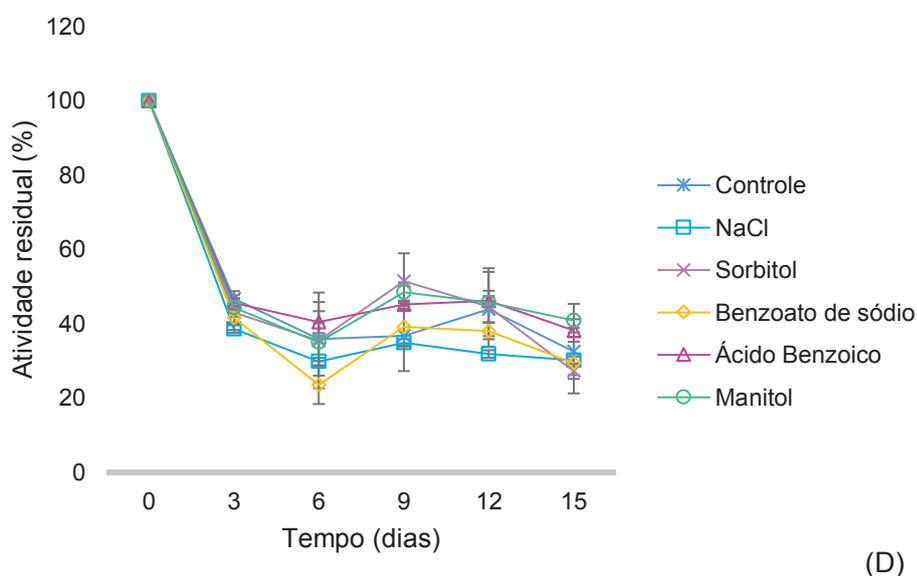
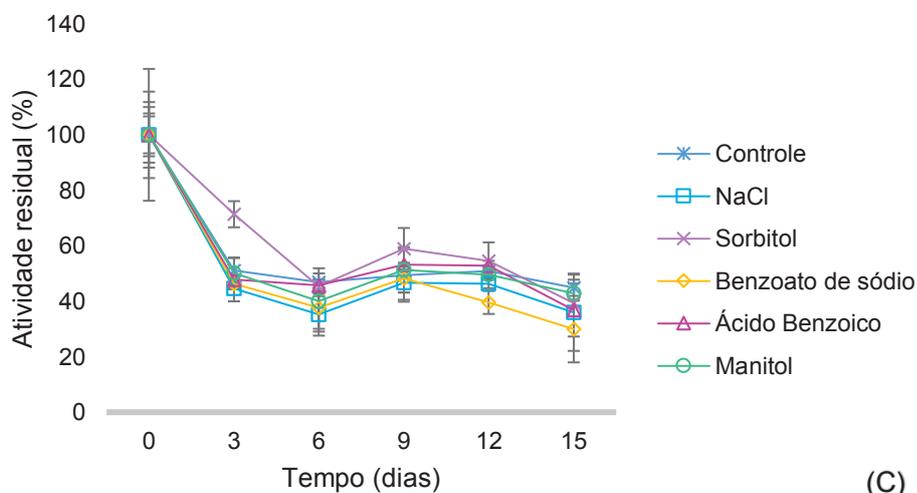
FIGURA 6-5– ESTABILIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES SOB EFEITO DE ADITIVOS EM CONDIÇÕES ACELERADAS



FONTE: A autora (2018)

LEGENDA: Perfil de decréscimo de atividade residual para FPase (A) e CMCCase (B) em meio formulado

FIGURA 6-6— ESTABILIDADE ENZIMÁTICA DAS HEMICELULASES SOB EFEITO DE ADITIVOS EM CONDIÇÕES ACELERADAS



FONTE: A autora (2018)

LEGENDA: Perfil de decréscimo de atividade residual para xilanase (C) e mananase (D) em meio formulado

De acordo com os dados, o ácido benzoico se mostrou o melhor aditivo para manutenção da atividade enzimática, dentre todos eles, mantendo 20% da atividade de FPase, 62% da atividade de CMCCase, 38% da atividade de xilanase e 36% da atividade de mananase após os 15 dias de realização dos testes. Entre os poliois, o sorbitol apresentou melhor resultado para as celulases (manutenção de 13% da atividade inicial de FPase, contra 9% do manitol e 62% da atividade de endoglucanase, contra 54% mantida pelo manitol) e o manitol para as hemicelulases

(46% da atividade mantida de xilanase contra 40,7% mantida pelo sorbitol e 37% da atividade de mananase mantida contra 18,6% mantida pelo sorbitol). Levando em consideração o maior interesse pelas celulases e que o sorbitol também foi capaz de preservar a atividade de xilanase e mananase, mesmo em menor proporção, decidiu-se manter como aditivos o ácido benzoico e o sorbitol. Essa semelhança de atuação pode ser devida ao fato que os dois álcoois são isômeros (ROWE; SHESKEY; QUIN, 2009).

Foi possível notar que o ácido benzoico causou um aumento na atividade das enzimas no dia zero, provavelmente isto se deu devido a uma redução no pH do meio fermentado. Conforme foi visto no item 6.3.1.2, todas as enzimas estudadas atuam melhor em pH's ácidos, enquanto o caldo fermentado apresenta pH em torno de 8, mesmo que a fermentação se inicie em pH 5.

A menção à utilização de ácido benzoico na formulação de enzimas é rara na literatura, apesar de ser um aditivo potencial, aprovado pelas legislações e comumente aplicado em alimentos, cosméticos e medicamentos, principalmente devido ao seu potencial antimicrobiano (ROWE; SHESKEY; QUIN, 2009). Apesar de ser um antimicrobiano efetivo, o ácido benzoico não é considerado danoso ao meio ambiente, e possui baixa toxicidade em humanos (OMS, 2000).

O sorbitol, por sua vez, funciona como umectante, plasticizante, estabilizante, edulcorante e encapsulante. É muito utilizado em soluções proteicas, por ser capaz de estabilizar a estrutura da proteína nessas condições. Uma vantagem adicional do sorbitol é que ele é quimicamente inerte, sendo compatível com a maioria dos demais aditivos utilizados nas formulações (ROWE; SHESKEY; QUIN, 2009). O sorbitol tem sido bastante estudado na formulação de enzimas para as mais diversas aplicações, inclusive é apresentado em patentes de produtos formulados (HABICH; BRAUN, 2005; RAJAKARI; HOTAKAINEN; MYLLARINEN, 2014).

Os dois aditivos escolhidos, além de serem aceitos pela legislação brasileira, também são admitidos na Europa e pelo FDA (*Food and Drug Administration*). (ROWE; SHESKEY; QUIN, 2009).

6.3.4.1. Determinação das concentrações dos aditivos

Após a escolha dos dois aditivos, foi feita, através de um planejamento fatorial do tipo DCCR, análise de suas concentrações para determinação da melhor condição de formulação para manutenção da atividade enzimática em teste de estabilidade acelerada. A TABELA 6-8 reúne as atividades residuais nas condições estudadas para até nove dias de exposição à alta temperatura.

TABELA 6-8-ATIVIDADES RESIDUAIS RESULTANTES DA COMBINAÇÃO DO SORBITOL E ÁCIDO BENZOICO E SUAS CONCENTRAÇÕES EM UM PLANEJAMENTO FATORIAL DO TIPO DCCR 2³

| AB (%) | Sorbitol (%) | 3 DIAS | | | 6 DIAS | | | 9 DIAS | | | | | |
|--------|--------------|-----------|------------|--------------|--------------|-----------|------------|--------------|--------------|-----------|------------|--------------|--------------|
| | | Fpase (%) | CMCase (%) | Xilanase (%) | Mananase (%) | Fpase (%) | CMCase (%) | Xilanase (%) | Mananase (%) | Fpase (%) | CMCase (%) | Xilanase (%) | Mananase (%) |
| 0,025 | 45,400 | 23,544 | 50,175 | 52,163 | 38,514 | 21,939 | 30,856 | 53,766 | 35,702 | 22,942 | 46,495 | 78,489 | 26,296 |
| 0,025 | 54,600 | 23,086 | 46,361 | 43,629 | 34,981 | 24,227 | 36,428 | 45,816 | 36,015 | 21,073 | 55,721 | 60,696 | 32,889 |
| 0,075 | 45,400 | 27,140 | 47,894 | 43,118 | 36,847 | 20,376 | 38,778 | 53,345 | 34,528 | 22,029 | 43,883 | 54,908 | 33,585 |
| 0,075 | 54,600 | 24,423 | 59,930 | 42,108 | 37,879 | 23,715 | 20,528 | 54,925 | 37,122 | 22,034 | 38,294 | 54,476 | 34,011 |
| 0,015 | 50,000 | 34,845 | 43,280 | 44,197 | 40,474 | 27,832 | 34,953 | 38,184 | 42,161 | 29,351 | 39,201 | 58,383 | 36,897 |
| 0,085 | 50,000 | 23,758 | 35,648 | 36,868 | 38,652 | 19,280 | 32,877 | 47,236 | 36,532 | 31,275 | 41,190 | 51,476 | 34,385 |
| 0,050 | 43,500 | 27,175 | 52,795 | 51,487 | 43,589 | 25,804 | 28,156 | 55,075 | 45,516 | 27,819 | 45,149 | 59,533 | 38,908 |
| 0,050 | 56,500 | 26,788 | 50,181 | 53,438 | 41,906 | 16,095 | 30,888 | 58,662 | 37,222 | 32,924 | 50,946 | 60,683 | 32,213 |
| 0,050 | 50,000 | 33,817 | 44,579 | 48,315 | 42,880 | 20,392 | 36,094 | 48,180 | 40,614 | 37,148 | 40,190 | 71,083 | 33,208 |
| 0,050 | 50,000 | 29,220 | 69,243 | 48,890 | 35,479 | 22,556 | 59,340 | 49,422 | 31,477 | 30,315 | 77,221 | 67,359 | 31,621 |
| 0,050 | 50,000 | 28,111 | 79,430 | 56,846 | 38,465 | 23,032 | 59,620 | 53,638 | 33,436 | 30,160 | 79,701 | 78,072 | 25,002 |
| 0,050 | 50,000 | 28,050 | 64,982 | 54,768 | 37,726 | 25,219 | 54,583 | 55,462 | 33,505 | 32,826 | 54,825 | 69,216 | 35,471 |

FONTE: A autora (2018)

AB- Ácido benzoico

Os dados da TABELA 6-8 apontam que a condição intermediária (0,05% de ácido benzoico e 50% de sorbitol) mostrou-se mais efetiva para a manutenção da FPase, com até 37% de manutenção de atividade após 9 dias de exposição ao stress. Os resultados das demais enzimas mostraram-se inconclusivos e, a análise estatística do planejamento mostrou que não houve influência significativa das concentrações dos aditivos sobre a manutenção das atividades. A única exceção encontrada foi a xilanase, que, para os períodos de 3 e 9 dias foi influenciada negativamente (efeito quadrático) pela concentração de ácido benzoico.

Dadas as informações analisadas, decidiu-se manter a concentração intermediária de sorbitol e ácido benzoico para análise de vida de prateleira a longo prazo.

6.3.4.2. *Análise de estabilidade do produto formulado*

O complexo enzimático formulado foi, então, mantido à temperatura ambiente e refrigerada para análise de sua estabilidade com o tempo. Para a FPase, em 30 dias, não houve redução da atividade do produto formulado tanto sob refrigeração quanto à temperatura ambiente, enquanto o concentrado sem adição dos aditivos manteve 80% da atividade enzimática, também nas duas condições de armazenamento.

Após 60 dias, foi identificada contaminação nas amostras de concentrado não formulado que estavam sob temperatura ambiente. A amostra então não foi mais considerada para os testes.

O material formulado refrigerado, no entanto, manteve-se com as mesmas características visuais e 100% de atividade de FPase. O formulado sob temperatura ambiente manteve 65% de atividade (em 60 dias).

A CMCase mostrou maior estabilidade tanto no período de 30 dias, quanto no de 60, uma vez que o formulado manteve 100% de sua atividade, assim como a FPase. O controle (concentrado sem aditivos), por sua vez, perdeu 3% de atividade catalítica

A xilanase, ao contrário das demais, não se mostrou estável com o passar do tempo, sendo que o produto formulado manteve 73% da atividade e o concentrado 63%, mesmo refrigerado. Com 60 dias de armazenamento, o formulado mostrava 58% da atividade inicial, enquanto o concentrado, apenas 46%. A mananase manteve 100% da atividade tanto no produto formulado quanto no concentrado sem formulação nos dois espaços de tempo avaliados.

Após 90 dias de armazenamento sob refrigeração, FPase e CMCase mantiveram 100% de atividade no produto formulado, enquanto seus controles mantiveram, respectivamente, 14% e 59% da atividade inicial. A xilanase, no formulado, apresentou 60% de atividade aos 90 dias, mantendo o valor que havia sido encontrado para os 60 dias de armazenamento. Seu controle, todavia, manteve apenas 32% da atividade. Finalmente, a mananase, no formulado, manteve 90% de sua atividade nesse período, enquanto seu respectivo controle não apresentou atividade após os 90 dias.

As características térmicas estudadas já indicavam que a xilanase possuía menor resistência às intempéries, uma vez que tinha mostrado valores menores de tempo de meia-vida e menor quantidade de energia necessária para sua inativação, quando comparada às demais enzimas.

6.4. CONCLUSÃO

Após a realização dos testes descritos, foi possível avaliar as melhores condições térmicas e químicas de aplicação do extrato enzimático fermentado por *Aspergillus* sp. a partir dos cachos vazios dos frutos da palma oleaginosa. Foi possível ainda caracterizar o comportamento energético das proteínas produzidas. Finalmente, também foram estudadas as condições de *downstream*, aplicando eficientemente o sistema de filtração tangencial para obtenção de um produto adequado para aplicação.

Avaliou-se também como positiva a estabilidade do produto formulado durante o armazenamento, sendo que a maioria das enzimas manteve 100% de sua atividade nos tempos estudados. O produto formulado está, então, em condições de

ser aplicado na hidrólise do material lignocelulósico em estudo e testes estão sendo conduzidos nesse sentido.

7. ESTUDO DE PRÉ-TRATAMENTO E APLICAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO PRODUZIDO NA SACARIFICAÇÃO DE RESÍDUO EFB

7.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de processos de produção de biomoléculas a partir de material lignocelulósico é inevitavelmente acompanhado de uma etapa de pré-tratamento, que é aplicado para remover partes do material que não sejam desejáveis no processo e facilitar o acesso à celulose, principal molécula-alvo da biorrefinaria de segunda geração. Além de separar as partes do material, o tratamento também auxilia afetando a estrutura da celulose, deixando-a mais amorfa, ou seja, mais facilmente hidrolisável por celulases, que a converterão em açúcares fermentescíveis para posterior fermentação; também aumenta a porosidade e a área de superfície da biomassa (BEHERA et al., 2014; RAJENDRAN et al., 2017).

A literatura apresenta diversas formas de executar essa operação, sobretudo tratamentos termoquímicos e físicos que utilizam temperatura, pressão e catalisadores químicos e biológicos. Processos comuns são a explosão a vapor (com ou sem catálise ácida) (SCHNEIDER et al., 2018), hidrólise com ácido diluído (RAJAN; CARRIER, 2014; SIEVERS et al., 2017), amônia (HARAHAP; KRESNOWATI, 2018), peróxido de hidrogênio (BANERJEE et al., 2011; CABRERA et al., 2014; RABELO et al., 2014), sulfitos, hidróxidos (SAFARI; KARIMI; SHAFIEI, 2017; RAHMAN et al., 2018; ZHAO et al., 2019), solventes orgânicos (ZHANG; PEI; WANG, 2016) e água quente (ZHUANG et al., 2015; YU et al., 2016). Também são reportados pré-tratamentos biológicos (WAN; LI, 2012; LARRAN et al., 2015).

A escolha do pré-tratamento é dependente, sobremaneira, da estrutura que se deseja remover. Os tratamentos ácidos são aplicados para remoção das hemiceluloses, bem como a explosão a vapor e os tratamentos hidrotérmicos, enquanto que os tratamentos alcalinos são destinados à solubilização da lignina (SUN et al., 2016). Caso seja necessário remover as duas estruturas, tratamentos sequenciais devem ser realizados, tal como realizado por Medina et al (2015) e Chen et al (2017).

No contexto da biorrefinaria de segunda geração, o pré-tratamento é um gargalo do processo, uma vez que apresenta alto custo de aplicação, devido, principalmente, à demanda de energia para sua ação efetiva, custo de construção de reatores, compra de catalisadores e custos de operação de forma geral (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). Os tratamentos hidrotérmicos e com sulfito, por exemplo, requerem temperaturas médias acima dos 150°C, conseqüentemente, requerem alta pressão (YU et al., 2016).

Muitos tratamentos ácidos e alcalinos descritos na literatura também utilizam temperaturas e pressões elevadas (BEHERA et al., 2014). Além disso, é de pouco proveito reaproveitar um resíduo em biorrefinaria e gerar outra quantidade de resíduo de difícil tratamento e com elevada concentração de produtos tóxicos, tal como acontece no uso dos ácidos, que promovem a liberação de furfurais, hidroximetilfurfurais e compostos acetilados, além de alto consumo de água. Alguns desses produtos são ainda inibitórios para o crescimento dos micro-organismos fermentadores (BEHERA et al., 2014; JÖNSSON; MARTÍN, 2016; RAJENDRAN et al., 2017). Assim sendo, urge otimizar os processos de pré-tratamento, de modo que haja menor consumo de energia, menor gasto com catalisadores, menor consumo de água e baixa geração de resíduos.

A produção de palma no Brasil tem crescido consideravelmente nos últimos anos (INDEX MUNDI, 2018), e uma das responsáveis por esse desenvolvimento é a Biopalma da Amazônia S.A, do grupo VALE, onde são produzidos também o óleo de palmiste e a torta de Kernel. Atuando na Região Norte do país, está situada nos municípios de Acará, Concórdia do Pará, Moju e Tomé-Açu, todos no estado do Pará (BIOPALMA, 2018b; BIOPALMA, 2016).

No processo de produção, é gerada uma quantidade preocupante de resíduo sólido, resíduo esse que tem sido destinado a produzir energia (HARSONO et al., 2013) e fertilizantes para o solo (BIOPALMA, 2016). Mas nem todo o resíduo tem esse destino. É preciso encaminhar esse resíduo a um novo processo, em que seja possível lhe atribuir algum valor maior do que o da simples queima. O cenário da biorrefinaria de segunda geração mostra-se uma oportunidade pertinente, e vem ao encontro dos desejos dos produtores de óleo de palma de agregar valor ao seu material residual e não depositá-los aos montes nas áreas florestais, que geralmente

estão nas cercanias das fazendas de palma. É uma alternativa sustentável e lucrativa.

Os resíduos sólidos do processamento do óleo de palma incluem resíduos de fazenda (folhas e troncos) e de processo propriamente dito, como os cachos vazios dos frutos, que são separadas em debulhadeiras: os frutos seguem para prensagens e os cachos vazios (EFB de *empty fruit bunches*) vão para queima, processo que tem contribuído para a liberação de gases do efeito estufa e para a poluição do ar. Outros resíduos seriam as fibras resultantes das prensagens (que podem ser usadas em ração animal), e as conchas das amêndoas (que se localizam no interior do fruto, e das quais é produzido o óleo de palmiste). O EFB é o resíduo sólido produzido em maior quantidade, sendo que para cada tonelada de óleo produzido, é gerada 1,1 tonelada de EFB (ALRIOLS et al., 2009; NORUL IZANI et al., 2013; CHIN et al., 2015; MEDINA et al., 2015 ; SIVASANGAR et al., 2015).

Desse modo, e considerando os possíveis impactos relacionados, utilizando material residual da Biopalma, divisão da VALE S. A., foi realizado este estudo, que teve como objetivo avaliar as possibilidades e condições de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica da palma (fração EFB) para e aplicar o complexo enzimático produzido no contexto da produção *on-site* para produção de açúcares fermentescíveis.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1. Preparo e caracterização centesimal do material lignocelulósico

O resíduo dos cachos vazios dos frutos de palma (EFB) foi seco em estufa a 60°C, moído em moinho de facas e separado em tamizador de acordo com sua granulometria. Nas fermentações desenvolvidas, foi utilizada a fração com granulometria entre 0,35 e 0,42 mm. Foi realizada uma caracterização estrutural, utilizando para tal a metodologia da NREL – NREL/TP-510-42618 (SLUITER et al., 2008) que permite determinar os teores de lignina, celulose e hemicelulose da biomassa vegetal, assim como cinzas e extraíveis.

7.2.2. Seleção do pré-tratamento

Para a seleção do tipo de pré-tratamento foram utilizados catalisadores alcalinos indicados na literatura: H₂O₂ alcalinizado a pH 11 com NaOH 5M, em banho-maria a 30°C por 24 e 48 horas; Na₂SO₃ 5% em autoclave a 130°C e NaOH 5% (m/v) em banho-maria a 30°C, por 24 e 48 horas (HUANG et al., 2017; MEDINA et al., 2015; CABRERA et al., 2014; BANERJEE et al., 2011). Os testes dessa etapa foram realizados em triplicatas, com uma proporção de palma:solução de 1:10.

A determinação das condições ideais de tratamento foi baseada no rendimento de açúcares, definido como a quantidade de massa de açúcar gerada por grama de palma. Também foi calculado a eficiência da conversão de celulose em glicose e hemicelulose em xilose, estabelecida pela razão entre a massa de glicose (ou xilose) por grama de palma e a massa de celulose (ou hemicelulose) por grama de palma.

7.2.3. Hidrólise enzimática com celulase comercial

As hidrólises enzimáticas foram feitas utilizando a enzima CellicCtec2® da Novozymes® na concentração de 1,7% (v/v). Os sólidos dos cachos vazios dos frutos de palma estavam presentes na proporção de 14% (m/v) em relação à solução enzimática. Tais valores de concentração foram determinados em estudos prévios. As condições operacionais foram de 50°C em banho-maria sob agitação de 100 rpm por 72 horas.

7.2.4. Determinação de condições do pré-tratamento

O pré-tratamento escolhido teve, então, os parâmetros de estudo concentração de NaOH (% m/v), tempo (min) e temperatura (°C) variados através de um planejamento fatorial completo 2³, como consta na TABELA 7-1:

TABELA 7-1–NÍVEIS E FATORES DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ PARA ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO DO RESÍDUO DOS CACHOS VAZIOS DA PALMA

| Níveis | Variáveis | | |
|--------|--------------|-----------------|------------------|
| | NaOH (% m/v) | Tempo (minutos) | Temperatura (°C) |
| -1 | 2,5 | 30 | 100 |
| 0 | 5 | 45 | 110 |
| 1 | 7,5 | 60 | 120 |

FONTE: A autora (2016)

Como consta na TABELA, as variáveis do presente estudo foram avaliadas com o intuito de selecionar condições que otimizem o uso do subproduto e minimizem os gastos de energia no pré-tratamento.

7.2.5. Determinação de açúcares

Para quantificar os açúcares liberados nas hidrólises enzimáticas foi utilizado o método de Miller (1959), que emprega o ácido 3,5-dinitrossalicílico como cromóforo. Nos ensaios, 1 mL de reativo de DNS era adicionado a 1 mL da amostra e a mistura era posta em banho em ebulição por 5 minutos, seguido de banho de gelo pelo mesmo tempo. Em seguida, eram adicionados 5 mL de água e agitados os tubos. Por fim, as amostras eram lidas em espectrofotômetro a 540 nm.

O perfil detalhado dos açúcares (glicose e xilose) obtidos foi obtido por cromatografia líquida de alta resolução (fase móvel H₂SO₄ 5 mM, 0,6 mL/min; coluna a 60°C, detector de índice de refração).

7.2.6. Produção de açúcares fermentescíveis a partir de resíduos de EFB utilizando o complexo enzimático produzido por *Aspergillus* sp.

O EFB pré-tratado nas condições definidas neste estudo foi hidrolisado utilizando a enzima formulada, descrita no Capítulo 6, para produzir açúcares

fermentescíveis. A hidrólise foi feita utilizando o produto sem diluição na proporção de 14% (m/v) de sólidos de EFB em relação ao volume de enzima. Paralelamente, foi feito mesmo procedimento, utilizando a enzima comercial CellicCTec®, como descrito no item 2.3. O processo foi executado a 50°C e 100 rpm, durante 24 e 48 horas. As hidrólises foram realizadas em duplicatas. Os açúcares da hidrólise foram quantificados pelo método do DNS de Miller (1959) e analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA), a 95% de confiança.

Simultaneamente, o resíduo sólido gerado na fermentação, consistindo em resíduo de EFB e biomassa microbiana, foi seco e pré-tratado nas mesmas condições do resíduo de EFB mencionado acima. Em seguida, foi hidrolisado e seus açúcares analisados também nas mesmas condições de operação e análise.

7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1. Caracterização centesimal do resíduo dos cachos vazios dos frutos de palma

A caracterização centesimal do resíduo de cachos vazios dos frutos de palma, utilizado nos estudos de pré-tratamento está apresentada na TABELA 7-2:

TABELA 7-2. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO RESÍDUO DE EFB

| Componente | Composição (%) |
|-----------------------------|-----------------------|
| Celulose | 27,677 ± 4,580 |
| Hemicelulose | 23,771 ± 1,233 |
| Lignina | 26,726 ± 0,811 |
| Cinzas | 2,032 ± 0,188 |
| Extraíveis em éter | 6,526 ± 0,608 |
| Extraíveis em etanol | 3,197 ± 0,043 |
| Extraíveis em água | 2,008 ± 0,144 |
| Grupos acetato | 2,347 ± 0,386 |
| Umidade | 6,551 ± 0,212 |

FONTE: A autora (2017)

Foi observado que os dados obtidos são similares àqueles encontrados na literatura para o mesmo resíduo. A TABELA 7-3 mostra um breve comparativo dos valores obtidos neste trabalho e aqueles encontrados na literatura:

TABELA 7-3– COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE RESÍDUOS DE CACHOS VAZIOS DE FRUTOS DE PALMA EM DIFERENTES ESTUDOS

| Composição (%) | | | | | Origem | Referência |
|----------------|--------------|--------------|-------------|--------------|---------------|---------------------------------------|
| Celulose | Hemicelulose | Lignina | Cinzas | Extraíveis | | |
| 35,4 | 21,9 | 19 | 6,8 | 16,8 | Colômbia | Cardona et al., 2018 |
| 40,49 | 34,57 | 11,54 | --- | --- | Tailândia | Parnthong; Kungsanant; Chavadej, 2018 |
| 35,3 | 18,4 | 23,3 | --- | --- | Malásia | Tan et al., 2016 |
| 28 | 24,12 | 19,96 | 3,19 | 17,01 | Brasil | Medina et al., 2015 |
| 27,68 | 23,77 | 26,73 | 2,03 | 11,73 | Brasil | Este trabalho |

FONTE: A autora (2018)

Os dados apontados foram obtidos utilizando as mesmas metodologias, porém foram empregadas matérias-primas de regiões diferentes. Destaca-se um maior teor de celulose nos resíduos caracterizados na Tailândia (40,49%), Malásia (35,30%) e Colômbia (35,49%). O teor de celulose encontrado no presente estudo (27,68%) assemelha-se àquele encontrado por Medina e colaboradores (2015) (28%), também utilizando o resíduo brasileiro.

7.3.2. Seleção dos pré-tratamentos termoquímicos para exposição da celulose do resíduo de cachos vazios dos frutos de palma

O material pré-tratado termoquimicamente foi submetido à hidrólise enzimática com a CellicCtec2®, complexo da *Novozymes*® composto de celulases e hemicelulases. As concentrações de açúcares liberados nesse processo estão dispostas na TABELA 7-4, bem com a porcentagem de perda de massa após o tratamento químico e o rendimento em termos de massa de açúcar obtida por grama de palma no início do processo.

TABELA 7-4 – RENDIMENTOS DAS HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS DOS RESÍDUOS DE CACHOS VAZIOS DE PALMA PRÉ-TRATADOS

| Pré-tratamento | Perda de massa | Glicose (g/L) | Xilose (g/L) | Rendimento em glicose (g glicose/g palma) | Rendimento em xilose (g xilose/g palma) |
|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---|---|
| H ₂ O ₂ (24 h) | 18,500 ± 3,610 ^a | 12,923 ± 0,734 ^d | 6,288 ± 0,433 ^f | 0,075 ± 0,001 ⁱ | 0,037 ± 0,004 ^k |
| H ₂ O ₂ (48 h) | 21,733 ± 0,896 ^a | 12,101 ± 0,519 ^d | 6,153 ± 0,458 ^f | 0,067 ± 0,004 ⁱ | 0,034 ± 0,003 ^k |
| NaOH (24 h) | 32,000 ± 0,954 ^b | 25,804 ± 4,474 ^e | 25,329 ± 4,002 ^g | 0,125 ± 0,023 ^j | 0,123 ± 0,002 ^l |
| NaOH (48 h) | 32,77 ± 0,208 ^b | 24,830 ± 1,668 ^e | 24,967 ± 1,275 ^g | 0,119 ± 0,008 ^j | 0,120 ± 0,006 ^l |
| NaOH (autoclave) | 50,8 ± 6,670 ^c | 31,583 ± 8,109 ^e | 34,845 ± 6,996 ^h | 0,109 ± 0,018 ^j | 0,121 ± 0,001 ^l |
| Na ₂ SO ₃ | 23,33 ± 1,626 ^a | 15,971 ± 0,070 ^d | 11,114 ± 0,331 ^f | 0,087 ± 0,002 ⁱ | 0,061 ± 0,002 ^m |

FONTE: A autora (2018)

LEGENDA: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa; letras iguais nas colunas indicam que os tratamentos não apresentaram diferença significativa

Pode ser visto na TABELA 7-4 que os tratamentos com peróxido de hidrogênio geraram resíduos que, quando submetidos posteriormente à hidrólise enzimática, apresentaram baixas concentrações de açúcar. Contudo, como houve pouca perda de massa no tratamento químico em comparação aos demais tratamentos, o rendimento da produção foi de 0,075 gramas de glicose por grama de palma. Os tratamentos com NaOH mostraram-se mais eficientes, tanto em termos de concentração de açúcares no caldo hidrolisado quanto em termos de rendimento.

As etapas de hidrólise com os catalisadores químicos e com as enzimas devem ainda ser otimizados para obtenção de rendimentos superiores. Levando em

consideração que o resíduo possui 0,27 g de celulose por grama de palma, o melhor rendimento de hidrólise foi aquele cujo tratamento foi realizado com NaOH, por 24 horas a 30°C, com 46% de eficiência. Em termos de produção de xilose, este tratamento também foi o mais eficiente, com 53% de eficiência. Alguns valores de recuperação de glicose descritos por Buratti e colaboradores (2018) em um teste de otimização de tratamento com NaOH são similares aos mencionados, que são apenas parte de testes de triagem, estando entre 50 e 80% de rendimento em relação à biomassa inicial. Os autores obtiveram tais resultados hidrolisando resíduos de poda de pessegueiros com NaOH em concentrações similares (2,5 a 7,5%) àquela utilizada neste estudo.

A análise de variância dos dados mostrou que houve diferença significativa entre os tratamentos para todas as respostas analisadas. Todos os F calculados mostraram-se superiores ao f tabelado para 95% de confiança (3,11). Assim sendo, foi executado um teste de Tukey para comparação entre as médias. Foi visto que o tempo de reação para o H₂O₂ não fez diferença para nenhuma das respostas.

Os tratamentos alcalinos mostraram-se equivalentes em todas as condições para todas as respostas, exceto na perda de massa e produção de xilose, sendo que ambas foram maiores no processo em autoclave (NaOH 5% (m/v), a 120°C por 60 minutos). O tratamento com Na₂SO₃ mostrou respostas estatisticamente iguais às aquelas obtidas no tratamento com H₂O₂. E os tratamentos alcalinos apresentaram diferença significativa em relação aos demais tratamentos, mostrando maior eficiência, mesmo com maior perda de massa.

Ao utilizar peróxido de hidrogênio no pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar e posterior hidrólise com enzimas celulolíticas, Rabelo e colaboradores (2014), também avaliaram que o tempo de hidrólise não foi significativo na obtenção final de açúcares.

Ao realizar teste comparando diversos pré-tratamentos aplicados em capim-elefante, incluindo peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio, Eliana e colaboradores (2014) também identificaram como melhor tratamento o NaOH, o qual permitiu solubilizar mais de 80% da lignina da biomassa.

O uso de catalisadores alcalinos podem ser utilizados em condições mais brandas, até mesmo em temperatura ambiente, como mostrado neste estudo. Isso

pode fazer com que não haja necessidade de equipamentos mais caros ou de manutenção mais frequente, dado o menor risco de corrosão dos reatores (KIM; LEE; KIM, 2016). O material solubilizado pelos hidróxidos pode ainda ser utilizado na produção de outros bioprodutos de interesse, integrando o processo em um complexo de biorrefinaria. São descritos em literatura produtos como o biometano, nanopartículas com as mais diversas aplicações (ROOPAN, 2017; FIGUEIREDO et al., 2018; MATTINEN et al., 2018), resinas (JABLONSKIS et al., 2018), além de ligninases e diversos biopolímeros (CALVO-FLORES et al., 2015). As ações antimicrobianas e antioxidante das ligninas, devido à sua estrutura fenólica, também têm levado a estudos no desenvolvimento de aplicações médicas e farmacêuticas (CALVO-FLORES et al., 2015).

7.3.3. Determinação das melhores condições do tratamento alcalino

A TABELA 7-5 mostra os resultados obtidos no planejamento fatorial 2^3 , aplicado para avaliação das melhores condições do tratamento catalisado com NaOH.

TABELA 7-5–RENDIMENTOS E AÇÚCARES OBTIDOS NA HIDRÓLISE DO RESÍDUO DE EFB PRÉ-TRATADO COM NaOH NAS CONDIÇÕES ESPECIFICADAS PELO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³

| Ensaio | Concentração NaOH (%) | T (°C) | Tempo (min) | Concentração de glicose (g/L) | Concentração de xilose (g/L) | g glicose/ g palma | g xilose / g palma |
|--------|-----------------------|--------|-------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 2,5 | 100 | 30 | 4,963 | 15,332 | 0,024 | 0,073 |
| 2 | 7,5 | 100 | 30 | 20,339 | 28,634 | 0,078 | 0,110 |
| 3 | 2,5 | 120 | 30 | 19,253 | 35,215 | 0,075 | 0,137 |
| 4 | 7,5 | 120 | 30 | 27,884 | 24,723 | 0,084 | 0,075 |
| 5 | 2,5 | 100 | 60 | 15,228 | 20,301 | 0,063 | 0,084 |
| 6 | 7,5 | 100 | 60 | 22,748 | 25,008 | 0,074 | 0,082 |
| 7 | 2,5 | 120 | 60 | 29,574 | 45,741 | 0,114 | 0,176 |
| 8 | 7,5 | 120 | 60 | 25,154 | 20,694 | 0,076 | 0,063 |
| 9 | 5 | 110 | 45 | 18,550 | 26,115 | 0,067 | 0,095 |
| 10 | 5 | 110 | 45 | 24,344 | 34,332 | 0,088 | 0,124 |
| 11 | 5 | 110 | 45 | 24,083 | 30,957 | 0,085 | 0,110 |

FONTE: A autora (2018)

A análise estatística do planejamento foi realizada com o software Statistica versão 8. Foi observado que não houve influência significativa de nenhuma das variáveis sobre o rendimento em glicose do processo nem sobre a produção de glicose em si, sendo o R² desses dados 0,92, mostrando confiabilidade no resultado obtido para 95% de confiança. Para a concentração de xilose no hidrolisado e seu rendimento, foi significativamente influente apenas a interação da concentração do NaOH com a temperatura do tratamento de forma antagônica, de modo que a combinação de menores valores de concentração de NaOH com maiores temperaturas levam a melhores respostas, como também pode ser visto na TABELA 5-5. O R² para estas duas variáveis foi de 0,92 e 0,94, respectivamente.

A influência da concentração de NaOH sobre a perda de massa já era esperada, uma vez que, teoricamente, maiores quantidades de lignina devem ser

solubilizadas. Mas também deve ser levada em consideração que esse tipo de hidrólise também altera a estrutura dos polissacarídeos da parede celular, podendo solubilizá-los, ainda que em pequenas proporções.

Resultados similares de rendimento de açúcares (0,026 a 0,371 g glicose/g de biomassa lignocelulósica) foram obtidos por Shahabazuddin e colaboradores (2018) ao otimizar pré-tratamento alcalino de casca de arroz utilizando NaOH (0,5 a 2%); contudo, os autores encontraram relação significativa entre o tempo de hidrólise e a concentração de NaOH. Também contrariando os resultados obtidos neste estudo, Buratti e colaboradores (2018) encontraram influência significativa da concentração de NaOH sobre o rendimento.

Como os resultados indicam que não houve influência significativa das condições analisadas, decidiu-se manter as condições de menor concentração de NaOH (2,5% m/v), 120°C e 60 minutos, que apresentou o melhor rendimento em gramas de açúcares por grama de palma dentre as condições estudadas. Estas foram as condições aplicadas para pré-tratar a palma utilizada nos experimentos de hidrólise enzimática utilizando o formulado enzimático obtido nos procedimentos descritos no capítulo 4.

7.3.4. Produção de açúcares fermentescíveis a partir e resíduos de EFB utilizando o complexo enzimático produzido por *Aspergillus* sp.

A hidrólise enzimática dos resíduos de EFB e dos resíduos sólidos da fermentação foi efetiva na produção dos açúcares fermentescíveis, como mostrado na TABELA 7-6:

TABELA 7-6 – AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS LIBERADOS NA HIDRÓLISE DE EFB PRÉ-TRATADO E DO RESÍDUO SÓLIDO DA FERMENTAÇÃO PRÉ-TRATADO

| | | CellicCTec2® | Joycelulase® |
|------------------------------|------------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Açúcares totais (g/L) | 24 horas | | |
| | EFB PT | 0,835± 0,067 ^a | 2,599±0,379 ^c |
| | Resíduo da fermentação pré-tratado | 2,300± 0,490 ^b | 4,742±0,200 ^d |
| | 48 horas | | |
| | EFB PT | 4,395±0,022 ^e | 6,191±0,067 ^g |
| | Resíduo da fermentação pré-tratado | 5,907±0,468 ^f | 7,798±0,468 ^h |

FONTE: A autora (2019)

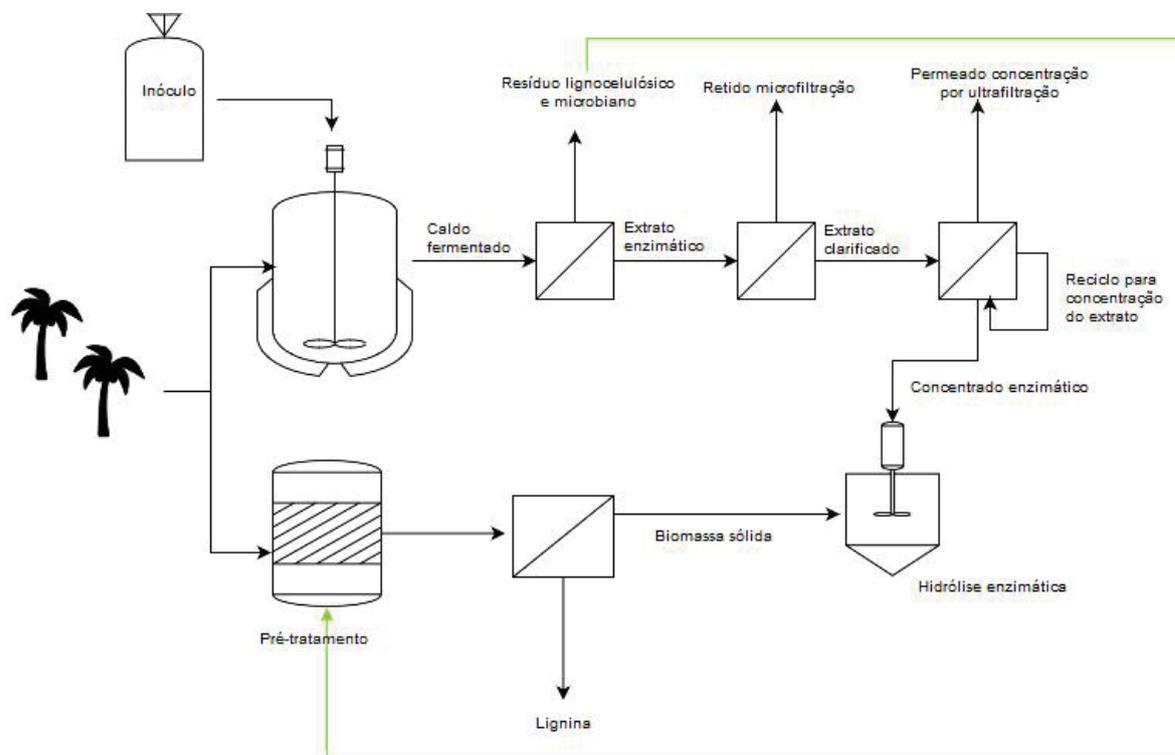
LEGENDA: Letras diferentes indicam concentrações de açúcares estatisticamente diferentes para 95% de confiança

A hidrólise com o produto formulado levou à formação de caldos hidrolisados com potencial para aplicação em processos fermentativos para produção de biomoléculas de segunda geração. Sua concentração mais elevada de açúcares, quando comparada à enzima comercial, se deve ao fato de que esta foi diluída (ver itens 2.3 e 2.6). Os resultados, porém, são animadores, uma vez que foi utilizado substrato de baixo custo na produção das enzimas e que este foi suficiente para suprir todas as necessidades do micro-organismo durante o processo fermentativo.

A hidrólise dos resíduos sólidos da fermentação, por sua vez, mostrou-se ainda mais efetiva do que aquela utilizando o resíduo apenas pré-tratado, como pode ser visto na TABELA 7-6. Esse fato provavelmente se deve às condições estruturais da fibra de biomassa lignocelulósica., levando-se em consideração que o micro-organismo já havia degradado-a parcialmente para produção das enzimas quando da fermentação. Essa possibilidade, contudo, precisa ser confirmada por análise de microscopia da fibra.

A FIGURA 7-1 mostra a nova abordagem em biorrefinaria desenvolvida pelo uso da enzima produzida *on-site* para hidrólise do próprio resíduo do processo fermentativo de produção da enzima e remete ao processo como inicialmente planejado e descrito na FIGURA 5-9, item 5-3 do Capítulo 5.

FIGURA 5-1 – PROCESSO DE BIORREFINARIA DE PRODUÇÃO *ON-SITE* E APLICAÇÃO DE ENZIMAS (HEMI)CELULOLÍTICAS UTILIZANDO RESÍDUO SÓLIDO EFB PARA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS E O RESÍDUO DA FERMENTAÇÃO COMO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS COM CATÁLISE DAS ENZIMAS PRODUZIDAS



FONTE: A autora (2019)

LEGENDA: A linha em verde mostra a modificação feita no processo quando comparado ao processo inicial

Os resultados obtidos no procedimento de hidrólise permitiram confirmar o potencial de uso do EFB na produção *on-site* de enzimas (hemi)celulolíticas e ainda introduzir um novo mecanismo de aplicação das enzimas, reutilizando resíduos do primeiro processo como alimentação do segundo, ampliando as possibilidades e firmando os bioprocessos desenvolvidos como aptos à abordagem de biorrefinarias de segunda geração.

7.4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho é possível afirmar que o EFB possui grande potencial de aplicação no desenvolvimento de processos *on-site* de produção e aplicação de enzimas dentro do contexto das biorrefinarias. Foi também

possível adicionar uma nova abordagem nesse contexto, utilizando resíduos do próprio processo fermentativo para aplicação das enzimas.

Foi ainda observado que a utilização de catalisadores alcalinos é efetiva na solubilização de componentes da biomassa lignocelulósica residual dos cachos vazios dos frutos de palma. Assim sendo, o tratamento com NaOH mostra-se promissor para integração no processo de biorrefinaria de segunda geração.

CONCLUSÕES GERAIS

Ao longo do andamento deste trabalho foi possível perceber a infinidade de possibilidades que podem ser estudadas e aplicadas no contexto de uma biorrefinaria, bem como os potenciais de um resíduo de biomassa geralmente considerado apenas como um descarte de um processo.

Várias técnicas foram cuidadosamente empregadas no desenvolvimento do bioprocesso de produção e aplicação *on-site* das enzimas, tanto biotecnológicas quanto analíticas, de modo que foi permitido o conhecimento tanto das características do substrato e suas nuances, quanto dos potenciais do produto enzimático gerado.

Elaborou-se um produto enzimático estável e eficiente utilizando um substrato residual de baixo custo, agregando-lhe valor maior que aquele concedido por seu destino inicial: a queima. Foi criado um bioprocesso de produção e aplicação deste produto enzimático dentro do contexto das biorrefinarias de segunda geração, que despontam como o futuro da produção de energia e moléculas de interesse comercial.

Todas as etapas do processo foram estudadas, de modo a serem definidas as condições mais adequadas para sua execução. A produção da enzima foi otimizada, o produto enzimático desenvolvido teve sua estabilidade em vida de prateleira confirmada, as enzimas foram caracterizadas, revelando seu comportamento diante de variações que podem incorrer do processo, e as condições de pré-tratamento da biomassa foram avaliadas e aplicadas em sua melhor forma.

Por fim, o formulado enzimático foi aplicado na hidrólise de EFB e no resíduo da própria fermentação pré-tratados, levando à produção de açúcares fermentescíveis. O uso do resíduo sólido do processo fermentativo de produção da enzima mostrou-se ainda mais efetivo do que o do EFB apenas pré-tratado. Assim, um novo caminho a ser explorado dentro do conceito da biorrefinaria foi concebido, permitindo uma integração ainda maior das etapas do processo e definindo novos paradigmas que podem ser amplamente estudados para as mais diversas biomassas e condições de operação.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Muitos estudos podem e devem ainda ser feitos visando o melhoramento do processo e um melhor conhecimento do produto desenvolvido. Inicialmente, o produto formulado pode ter mais características conhecidas através de caracterizações moleculares da estrutura das enzimas. Dentro do mesmo contexto, é possível também utilizar métodos moleculares para melhoramento genético do micro-organismo, de modo a induzir uma maior expressão das enzimas de interesse.

Um estudo dos demais resíduos e efluentes do processo é indicado, de modo que sejam gerados mais subprodutos que resíduos e que estes, quando produzidos, tenham destinos sustentáveis e não poluentes. A caracterização do efluente do processo de separação por membranas, em termos de DBO e DQO, pode ser feita, para que este seja descartado ou reutilizado sem causar danos ao meio ambiente.

Paralelamente, o processo de hidrólise deve ser mais explorado, com caracterização dos açúcares fermentescíveis produzidos pelas enzimas e otimização das condições operacionais, como temperatura, agitação e tempo de processo. Além da caracterização das fibras de EFB antes e depois da fermentação, bem como antes e depois da hidrólise.

Finalmente, o uso dos açúcares fermentescíveis deve ser analisado, seus potenciais na produção de biomoléculas como etanol, butanol e xilitol. Confirmado tal potencial para o crescimento dos micro-organismos e produção dos bioprodutos desejados, as condições de produção e *downstream* devem também ser estudadas e otimizadas.

REFERÊNCIAS

- ABRAPALMA. **Palma e sustentabilidade**. Disponível em: <
<http://www.abrapalma.org/pt/producao-sustentavel/>>. Acesso em 18 de abril de 2018.
- ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A. Optimization of upstream and downstream process parameters for cellulase-poor-thermo-solvent-stable xylanase production and extraction by *Aspergillus tubingensis* FDHN1. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, n. 1, p. 3, 2015.
- ADITIYA, H. B.; CHONG, W. T.; MAHLIA, T. M. I.; et al. Second generation bioethanol potential from selected Malaysia's biodiversity biomasses: A review. **Waste Management**, v. 47, p. 46–61, 2015. Elsevier Ltd.
- ADITIYA, H. B.; MAHLIA, T. M. I.; CHONG, W. T., et al. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 631-653, 2016.
- AJIJOLAKEWU, K. A.; LEH, C. P.; LEE, C. K.; WAN NADIAH, W. A. Characterization of novel *Trichoderma* hemicellulase and its use to enhance downstream processing of lignocellulosic biomass to simple fermentable sugars. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 166–175, 2017.
- ALAM, M. Z.; MAMUN, A. A.; QUDSIEH, I. Y., et al. 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.
- ALRIOLS, M. G.; TEJADO, A.; BLANCO, M.; et al. Agricultural palm oil tree residues as raw material for cellulose, lignin and hemicelluloses production by ethylene glycol pulping process. **Chemical Engineering Journal**, v. 148, n. 1, p. 106–114, 2009.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- ANG, S. K.; E.M., S.; Y., A.; A.A, S.; M.S, M. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1293–1302, 2013.

ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2224–2234, 2009.

ARRHENIUS, S. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, v. 4U, n. 1, 1889.

BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; SHOUCHE, Y.; NINNEKAR, H. Z. Xylanase production from *Penicillium citrinum* isolate HZN13 using response surface methodology and characterization of immobilized xylanase on glutaraldehyde-activated calcium-alginate beads. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, 2016

BAI, H.; ZI, H.; HUANG, Y.; et al. Catalytic Properties of Carboxymethyl Cellulase Produced from Newly Isolated Novel Fungus *Penicillium ochrochloron* ZH1 in Submerged Fermentation. **Catalysis Letters**, v. 147, n. 8, p. 2013–2022, 2017.

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. Elsevier Ltd.

BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J.; et al. Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. **Biotechnology for Biofuels**. V. 4:16, 2011.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v. 32, p. 1341-1346, 2012.

BARI, M. N.; ALAM, M. Z.; MUYIBI, S. A.; et al. Improvement of production of citric acid from oil palm empty fruit bunches: Optimization of media by statistical experimental designs. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 12, p. 3113–3120, 2009.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.

BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 91–106, 2014.

BHATIA, L.; JOHRI, S.; AHMAD, R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. **AMB Journal**, 2:65, p. 1-19, 2012.

BHUTTO, A. W.; HARIJAN, K.; QURESHI, K.; et al. Perspectives for the production of ethanol from lignocellulosic feedstock e A case study. **Journal of Cleaner Production**, v. 95, p. 184-193, 2015.

BIESEBEKE, R.; RUIJTER, G.; HOOGSCHAGEN, M. J.; et al. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations: Progress report on a multi-disciplinary project. **FEMS Yeast Research**, v. 2, p. 245-248, 2002.

BIODIESELBR. **Palma**. Disponível em: < <https://www.biodieselbr.com/plantas/palma/palma.htm> > Último acesso em 14 out. 2018.

BIOENERGY CONSULTS – Powering Clean Energy Future. **Uses of Empty Fruit Bunches**. Disponível em: < <https://www.bioenergyconsult.com/tag/uses-of-empty-fruit-bunch/> > Acesso em: 19 fev. 2018.

BIOPALMA – VALE. **Nossos produtos**. Disponível em: < <https://www.biopalma.com.br/nosso-produto> >. Último acesso em 08 Out. 2018a.

BIOPALMA – VALE. **Onde estamos**. Disponível em: < <https://www.biopalma.com.br/onde-estamos> >. Último acesso em 08 Out. 2018b.

BIOPALMA – VALE. **Relatório de sustentabilidade 2016**. Disponível em: < <https://www.biopalma.com.br/pdf/relatorio-sustentabilidade-2016.pdf> > Último acesso em: 08 Out. 2018.

BOYCE, A.; WALSH, G. Purification and Characterisation of a Thermostable β -Xylosidase from *Aspergillus niger* van Tieghem of Potential Application in Lignocellulosic Bioethanol Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 186, n. 3, p. 712–730, 2018

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRASIL - ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 166, de 27 de Julho de 2017. Critérios de Validação de Métodos Analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 27 de Jul. 2017.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC N° 54, DE 07 DE OUTUBRO DE 2014. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil n° 194**, Brasília, DF, 08 out. 2014a.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC N° 53, DE 07 DE OUTUBRO DE 2014. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil n° 194**, Brasília, DF, 08 out. 2014b.

BRASIL – INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos – Revisão 07 – Julho de 2018**. Documento de Caráter Orientativo. DOQ-CGCRE-008. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numeracao=00774&num_documento=008> Acesso em: 23 out 2018.

BURATTI, C.; FOSCHINI, D.; BARBANERA, M.; FANTOZZI, F. Fermentable sugars production from peach tree prunings: Response surface model optimization of NaOH alkaline pretreatment. **Biomass and Bioenergy**, v. 112, p. 128–137, 2018.

CABRERA, E.; MUÑOZ, M. J.; MARTÍN, R.; et al. Alkaline and alkaline peroxide pretreatments at mild temperature to enhance enzymatic hydrolysis of rice hulls and straw. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 1-7, 2014.

CALVO-FLORES, F.; DOBADO, J. A.; ISAC-GARCÍA, J.; MARTÍN-MARTÍNEZ. **Lignin and Lignans as Renewable Raw Materials – Chemistry, Technology and Applications**, Chichester: John Wiley & Sons, 2015.

CAMASSOLA, M.; J.P. DILLON, A. Cellulase Determination: Modifications to Make the Filter Paper Assay Easy, Fast, Practical and Efficient. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 01, n. S1, 2012.

CARDONA, E.; LLANO, B.; PEÑUELA, M.; et al. Liquid-hot-water pretreatment of palm-oil residues for ethanol production: An economic approach to the selection of the processing conditions. **Energy**, v. 160, p. 441–451, 2018.

de CARVALHO, J. C.; MEDEIROS, A. B. P.; VANDENBERGHE, L. P. S.; et al. Approaches for the Isolation and Purification of Fermentation Products. In: PANDEY,

A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. R. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering – Production, Isolation and Purification of Industrial Products**. 1. Ed. Amsterdam: Elsevier. 2017. p. 783-805.

CENTANNI, J. M.; ROY, M. J. **Biotechnology operations: principles and practices**. Second edition ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2017.

CHANG, S. H. An overview of empty fruit bunch from oil palm as feedstock for bio-oil production. **Biomass and Bioenergy**, v. 62, p. 174–181, 2014. Elsevier Ltd.

CHANG, Y.; CHANG, K.; HUANG, C.; et al. Comparison of batch and fed-batch fermentations using corncob hydrolysate for bioethanol production. **Fuel**, v. 97, p. 166-173, 2012.

CHAUHAN, P. S.; GUPTA, N. Insight into microbial mannosidases: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 190–201, 2017.

CHEN, B.-Y.; ZHAO, B.-C.; LI, M.-F.; et al. Fractionation of rapeseed straw by hydrothermal/dilute acid pretreatment combined with alkali post-treatment for improving its enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 127–133, 2017.

CHEN, H.; FU, X. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 468–478, 2016. Elsevier.

CHERUBINI, F. ; STROMMAN, A. H. Principles of Biorefining. In : PANDEY, A. ; LARROCHE, C. ; RICKE, S. C. ;et al. **Biofuels – Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. 1st ed. Oxford : Academic Press – Elsevier. 2011. 642 p.

CHIESA, S. ; GNANSOUNOU, E. Use of Empty Fruit Bunches from the Oil Palm for bioethanol production: A thorough comparison between dilute acid and dilute alkali pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 355-364, 2014.

CHIN, S. X.; CHIA, C. H.; ZAKARIA, S.; et al. Ball milling pretreatment and diluted acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch (EFB) fibres for the production of levulinic acid. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 52, p. 85–92, 2015.

CONNER, J.; WUCHTERL, D.; LOPEZ, M.; et al. The Biomanufacturing of Biotechnology Products. In: SHIMASAKI, C. **Biotechnology Entrepreneurship – Starting, Managing, and Leading Biotech Companies**. p.351–385, 2014. Elsevier

CUI, X.; ZHAO, X.; ZENG, J.; et al. Robust enzymatic hydrolysis of Formiline-pretreated oil palm empty fruit bunches (EFB) for efficient conversion of polysaccharide to sugars and ethanol. **Bioresource technology**, v. 166, p. 584–91, 2014. Elsevier Ltd.

CUNHA, F. M.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Effect of a novel method for in-house cellulase production on 2G ethanol yields. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 224–229, 2017.

CUNHA, F. M.; ESPERANÇA, M. N.; ZANGIROLAMI, T. C.; et al. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 270-274, 2012.

DALAGNOL, L. M. G.; SILVEIRA, V. C. C.; DA SILVA, et al. Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 80–87, 2017.

DALE, B. E.; KIM, S. Biomass Refining Global Impact – The Biobased Economy of the 21st Century. In: KAMM, B.; GRUBER, P. R.; KAMM, M. **Biorefineries – Industrial Processes and Products**. v. 1, Weinheim: Wiley-VCH. 2006. 948 p.

DAVIS, R. H. Microfiltration in Pharmaceuticals and Biotechnology. In: BASILE, A.; CHARCOSSET, C. **Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes**. Elsevier, p.29–67, 2019.

DAYLAN, B.; CILIZ, N. Life cycle assessment and environmental life cycle costing analysis of lignocellulosic bioethanol as an alternative transportation fuel. **Renewable Energy**, v. 89, p. 578–587, 2016. Elsevier Ltd.

DELABONA, P. DA S.; FARINAS, C. S.; DA SILVA, M. R.; et al. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 517–521, 2012.

DELABONA, P. S.; LIMA, D. J.; ROBL, D.; et al. Enhanced cellulase production by *Trichoderma harzianum* by cultivation on glycerol followed by induction on cellulosic substrates. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. v. 43, p. 617-626, 2016.

DHILON, G. S.; OBEROI, H. S.; KAUR, S.; et al. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1160-1167, 2011.

DIXON, C. K.; WILKEN, L. R. Purification and characterization of an autolytic enzyme for optimized hydrolysis of microalgae for multiple bioproduct extraction. Washington July 16 - July 19, 2017. **Anais...** American Society of Agricultural and Biological Engineers.

DIXON, W. J.; MOOD, A. M. The Statistical Sign Test. **Journal of the American Statistical Association**, v. 41, p. 557-566, 1946.

DOBLE, M. **Principles of downstream techniques in biological and chemical processes**. Oakville, ON Waretown, NJ: Apple Academic Press, 2016.

DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; TORRES-MUÑOZ, J. A.; LÓPEZ, R. A. Production of bioethanol from agro-industrial wastes. **Fuel**, v. 85-89, 2015.

DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. Waltham, Mass: Academic Press, 2013.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for serial correlation in least squares regression II. **Biometrika**, v. 38, p. 159-177, 1951.

EBRINGEROVÁ, A. Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses. **Macromolecular Symposia**, v. 232, n. 1, p. 1–12, 2005.

ELIANA, C.; JORGE, R.; JUAN, P.; LUIS, R. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. **Fuel**, v. 118, p. 41–47, 2014.

EVELEIGH, D. E.; MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 21, 2009.

EYRING, H. The Activated Complex in Chemical Reactions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 3, n. 2, p. 107–115, 1935.

FAHMA, F.; IWAMOTO, S.; HORI, N.; IWATA, T.; TAKEMURA, A. Isolation, preparation, and characterization of nanofibers from oil palm empty-fruit-bunch (OPEFB). **Cellulose**, v. 17, n. 5, p. 977–985, 2010.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **PALM OIL PROCESSING**. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/005/y4355e/y4355e04.htm> >. Último Acesso em: 14 out. 2018.

FELDA PALM INDUSTRIES. **Empty Fruit Bunches**. Disponível em: < <http://feldapalmindustries.com/v2/index.php/empty-fruit-bunch-efb/> > Acesso em: 19 fev. 2018.

FIGUEIREDO, P.; LINTINEN, K.; HIRVONEN, J. T.; et al. Enzymatically and chemically oxidized lignin nanoparticles for biomaterial applications. **Progress in Material Science**, v. 93, p. 233-269, 2018.

FISHER, R. A. On a distribution yielding the error functions of several well-known statistics", **Proc. Internat. Congress mathematicians (Toronto 1924)** , 2 , Univ. Toronto Press, p. 805–813, 1928.

FLASCHEL, E.; WANDREY, C.; KULA, M.-R. Ultrafiltration for the Separation of Biocatalysts. **Downstream Processing**. p.73–142, 1983. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

FOLHA DE SÃO PAULO. **É preciso parar de chamar matéria-prima de lixo**. 27 ago 2018. Disponível em: < <https://www1.folha.uol.com.br/seminariosfolha/2018/08/e-preciso-parar-de-chamar-materia-prima-de-lixo-afirma-ativista-ambiental.shtml> >. Acesso em: 20 out. 2018.

GASPAROTTO, J. M.; WERLE, L. B.; FOLETTTO, et al. Production of Cellulolytic Enzymes and Application of Crude Enzymatic Extract for Saccharification of Lignocellulosic Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, p. 560-572, 2015.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Applied Chemistry Division Commission on Biotechnology**, v. 59, n. 5, p. 257–268, 1987.

GOELZER, F. D. E. **Purificação e bioformulação de complexo xilanolítico produzido por via convencional e recombinante**. 2015. 220 f. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

GONÇALVES, C.; RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; GOMES, N.; et al. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods**, v. 2, n. 12, p. 2046, 2010.

GRUBBS, F. E. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, v. 11, p. 1-21, 1969.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550-567, 2015.

HABICH, A.; BRAUN, J. **Stabilized Enzyme Formulations**. 2005. Número de publicação: WO2005074705A1. Disponível em: <<https://patentimages.storage.googleapis.com/f5/f2/50/f7c575d9a594b3/WO2005074705A1.pdf>> Acesso em: 20 out. 2018.

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, p. 1055-1059, 2011.

HAN, W.; HE, M. The application of exogenous cellulase to improve soil fertility and plant growth due to acceleration of straw decomposition. **Bioresource Technology**, v. 10, p. 3724-3731, 2010.

HAN, X.; SONG, W.; LIU, G.; et al. Improving cellulase productivity of *Penicillium oxalicum* RE-10 by repeated fed-batch fermentation strategy. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 155–163, 2017

HAN, Y.; BASF ENZYMES. **A Liquid Formulation of Alpha-Amylase**. US Patents: US20190100738A1. Applied in 2016. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US20190100738A1/en>>. Acesso em 03 de Julho de 2019.

HANSEN, G. H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J. C.; et al. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1327-1341, 2015.

HARAHAP, B. M.; KRESNOWATI, M. T. A. P. Moderate pretreatment of oil palm empty fruit bunches for optimal production of xylitol via enzymatic hydrolysis and fermentation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 8, n. 2, p. 255–263, 2018.

HARRISON, R. G.; TODD, P. W.; RUDGE, S. R.; PETRIDES, D. P. **Bioseparations science and engineering**. Second edition ed. Oxford New York Aukland: Oxford University Press, 2015.

HARSONO, S. S.; GRUNDMAN, P.; LAU, L. H.; et al. Energy balances, greenhouse gas emissions and economics of biochar production from palm oil empty fruit bunches. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 77, p. 108–115, 2013.

HASUNUMA, T.; OKAZAKI, F.; OKAI, N.; et al. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 513–522, 2013.

HATAKEYAMA, H.; HATAKEYAMA, T. Lignin Structure, Properties, and Applications. In: ABE, A.; DUSEK, K.; KOBAYASHI, S. **Biopolymers – Lignin, Proteins, Bioactive Nanocomposites**. v. 232., p. 1-63, 2009.

HEIDORNE, F. O.; MAGALHÃES, P. O.; FERRAZ, A. L.; MILAGRES, A. M. F. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispora* grown on wood under biopulping conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3–4, p. 436–442, 2006.

HEMANSI; GUPTA, R.; KUHAD, R. C.; SAINI, J. K. Cost effective production of complete cellulase system by newly isolated *Aspergillus niger* RCKH-3 for efficient enzymatic saccharification: Medium engineering by overall evaluation criteria approach (OEC). **Biochemical Engineering Journal**, v. 132, p. 182–190, 2018.

HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 67–76, 1982.

HUANG, C.; RAGAUSKAS, A. J.; WU, X.; et al. Co-production of bio-ethanol, xylonic acid and slow-release nitrogen fertilizer from low-cost straw pulping solid residue. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 365–373, 2018.

HUNG, M. T.; LIU, J. C. Microfiltration of microalgae in the presence of rigid particles. **Separation and Purification Technology**, v. 198, p. 10–15, 2018.

INDEX MUNDI. **Palm Oil Production by Country in 1000T**. Disponível em: <<https://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=palm-oil>> Acesso em: 08 Abril. 2018a.

INDEX MUNDI. **Brazil Palm Oil Production by Year**. Disponível em: <<https://www.indexmundi.com/agriculture/?country=br&commodity=palm-oil&graph=production>> Acesso em: 08 abril. 2018b

INOUE, H.; KITAO, C.; YANO, S.; SAWAYAMA, S. Production of β -xylosidase from *Trichoderma asperellum* KIF125 and its application in efficient hydrolysis of pretreated rice straw with fungal cellulase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, 2016

JABLONSKIS, A.; ARSHANITSA, A.; ARNAUTOV, A.; et al. Evaluation of Ligno Boost™ softwood kraft lignin epoxidation as an approach for its application in cured epoxy resins. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 225-235, 2018.

JACOBS, J. L.; McALLAN, A. B. Enzymes as silage additives. 1. Silage quality, digestion, digestibility and performance in growing cattle. **Grass and Forage Science**, v. 46, p. 63-73, 1991.

JIN, H.; LIU, R.; HE, Y. Kinetics of Batch Fermentations for Ethanol Production with Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Growing on Sweet Sorghum Stalk Juice. **Procedia Environmental Sciences**, v. 12, p. 137-145, 2011.

JING, L; ZHAO, S.; XUE, J. et al. Isolation and characterization of a novel *Penicillium oxalicum* strain Z1-3 with enhanced cellobiohydrolase production using cellulase-hydrolyzed sugarcane bagasse as carbon source. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 666-675, 2015.

JOHNSON, K. A.; GOODY, R. S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. **Biochemistry**, v. 50, n. 39, p. 8264–8269, 2011.

JONOOBI, M.; KHAZAEIAN, A.; TAHIR, P. M. et al. Characteristics of cellulose nanofibers isolated from rubberwood and empty fruit bunches of oil palm using chemo-mechanical process. **Cellulose**, v. 18, n. 4, p. 1085–1095, 2011.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 2016.

JUNG, D. U.; YOO, H. Y.; KIM, S. B.; et al. Optimization of medium composition for enhanced cellulase production by mutant *Penicillium brasilianum* KUEB15 using statistical method. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 25, p. 145–150, 2015.

JUNG, Y. R.; PARK, J. M.; HEO, S.-Y.; et al. Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. **Renewable Energy**, v. 76, p. 66–71, 2015. Elsevier Ltd.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: Engineering, production and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1219-1227, 2012.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188-203, 2014.

KARIMI, K.; TAHERZADEH, M. J. A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 348-356, 2016.

KHEMAKHEM, I.; GARGOURI, O. D.; DHOUIB, A.; et al. Oleuropein rich extract from olive leaves by combining microfiltration, ultrafiltration and nanofiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 172, p. 310–317, 2017

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42–48, 2016.

KIM, S.; KIM, C. H. Production of cellulase enzymes during the solid-state fermentation of empty palm fruit bunch fiber. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 1–2, p. 61–67, 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.

KRISHNA, C. Solid-State Fermentation Systems—An Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 1-30, 2005.

KRISTIANI, A.; EFFENDI, N.; ARISTIAWAN, Y.; et al. Effect of Combining Chemical and Irradiation Pretreatment Process to Characteristic of Oil Palm's Empty Fruit Bunches as Raw Material for Second Generation Bioethanol. **Energy Procedia**, v. 68, p. 195–204, 2015.

KULASINSKI, K.; KETEN, S.; CHURAKOV, S. V.; et al. Comparative molecular dynamics study of crystalline, paracrystalline and amorphous states of cellulose. **Cellulose**, v. 21, p. 1103-1116, 2014.

KUPSKI, L.; PAGNUSSATT, F. A.; BUFFON, J. G.; FURLONG, E. B. Endoglucanase and Total Cellulase from Newly Isolated *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*: Production, Characterization, and Thermal Stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 458–468, 2014.

LARRAN, A.; JOZAMI, E.; VICARIO, L.; et al. Evaluation of biological pretreatments to increase the efficiency of the saccharification process using *Spartina argentinensis* as a biomass resource. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 320–325, 2015.

LEE, K. C.; TONG, W. Y.; IBRAHIM, D.; et al. Evaluation of Enzymatic Deinking of Non-impact Ink Laser-Printed Paper Using Crude Enzyme from *Penicillium rolsii* c3-2(1) IBRL. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, p. 451-463, 2016.

LELOIR, L. F. **Two decades of research on the biosynthesis of saccharides**. Nobel lecture. December 1970.

LI, S.; BASHLINE, L.; LEI, L.; GU, Y. **Cellulose Synthesis and its regulation**. The Arabidopsis Book, v. 12, 2014.

LI, Y.; LIU, C.; BAI, F.; ZHAO, X. Overproduction of cellulase by *Trichoderma reesei* RUT C30 through batchfeeding of synthesized low-cost sugar mixture. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 503-510, 2016.

LI, Y.; ZHANG, X.; XIONG, L.; et al. On-site cellulase production and efficient saccharification of corn stover employing cbh2 overexpressing *Trichoderma reesei* with novel induction system. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 643–649, 2017

LIAO, H.; ZHENG, H.; LI, S.; WEI, Z.; et al. Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Scientific Reports – Nature**, doi: 10.1038/srep12631, 2015.

LIBARDI JUNIOR, N. **Cellulase production recovery, formulation and application – a wastewater biorefinery approach**. 2018. 186 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

LIBARDI, N.; SOCCOL, C. R.; DE CARVALHO, J. C.; DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P. Simultaneous cellulase production using domestic wastewater and bioprocess effluent treatment – A biorefinery approach. **Bioresource Technology**, v. 276, p. 42–50, 2019.

LIBARDI, N.; SOCCOL, C. R.; GÓES-NETO, A.; DE OLIVEIRA, J.; VANDENBERGHE, L. P. S. Domestic wastewater as substrate for cellulase production by *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, v.57, p. 190-199, 2017.

de LIMA, D. R.; SILVEIRA, M. H. L.; DEL RIO, L.; RAMOS, L. P. Pretreatment Processes for Cellulosic Ethanol Production: Processes Integration and Modeling for the Utilization of Lignocellulosics Such as Sugarcane Straw. In: SOCCOL, C. R.; BRAR, S. K.; FAULDS, C.; RAMOS, L. P. **Green Fuels Technology – Biofuels**. Switzerland: Springer International Publishing. 2016. 558 p.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; van ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, p. 506–577, 2002.

MACENO, M. A. C.; DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P.; WOICIECHOWSKI, A. L.; et al. Production of Cellulases by *Phanerochaete* sp. Using Empty Fruit Bunches of Palm (EFB) as Substrate: Optimization and Scale-Up of Process in Bubble Column and Stirred Tank Bioreactors (STR). **Waste and Biomass Valorization**, v. 7, n. 6, p. 1327–1337, 2016

MADIGAN, M. T; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; et al. **Brock biology of microorganisms**. Fourteenth edition ed. Boston: Pearson, 2015.

MAEDA, R. N.; BARCELOS, C. A.; ANNA, L. M. M. S.; PEREIRA, N. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, v. 163 p. 38–44, 2013.

MALGAS, S.; VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between β -mannanase, β -mannosidase and α -galactosidase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 1167–1175, 2015.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, , n. 6, p. 21–33, 1976.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Cellulases and their applications**, v. 95, p. 391–414, 1969. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ba-1969-0095.ch023>>.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; ALFENAS, R. F.; et al. The influence of pretreatment methods on saccharification of sugarcane bagasse by an enzyme extract from *Chrysosporthe cubensis* and commercial cocktails: A comparative study. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 670-676, 2015.

MANSFIELD, S. D.; ESTEGHLALIAN, A. R. Applications of Biotechnology in the Forest Products Industry. In: MANSFIELD, S. D.; SADDLER, J. N. **Applications of Enzymes to Lignocellulosics**. Washington: American Chemical Society. 2003. 467 p.

MARÍN, M.; ARTOLA, A.; SÁNCHEZ, A. Optimization of Down-Stream for Cellulases Produced Under Solid-State Fermentation of Coffee Husk. **Waste and Biomass Valorization**, 2018.

MARQUES, N. P.; DE CASSIA PEREIRA, J.; GOMES, E.; et al. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 66–75, 2018.

MATTINEN, M; VALLE-DELGADO, J. J.; LESKINEN, T.; et al. Enzymatically and chemically oxidized lignin nanoparticles for biomaterial applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 111, p. 48-56, 2018.

MCDONALD, J. E.; ROOKS, D. J.; MCCARTHY, A. J. Methods for the Isolation of Cellulose-degrading Microorganisms. In: ABELSON, J. N.; SIMON, M. I. **Methods in Enzymology**. San Diego: Academic Press – Elsevier, 1st edition, 2012

MCNAMARA, J. T.; MORGAN, J. L. W.; ZIMMER, J. A molecular description of cellulose biosynthesis. **Annual Reviews on Biochemistry**, v. 84, p. 895-921, 2015.

MEDINA, J. D. C.; WOICIECHOWSKI, A.; ZANDONA FILHO, A.; NOSEDA, M. D.; KAUR, B. S.; SOCCOL, C. R. Lignin preparation from palm oil empty fruit bunches by

sequential acid/alkaline treatment – A biorefinery approach. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 172-178, 2015.

MEDINA, J. D. C.; WOICIECHOWSKI, A.; ZANDONA FILHO, A.; NIGAM, P. S.; RAMOS, L. P.; SOCCOL, C. R. Steam explosion pretreatment of oil palm empty fruit bunches (EFB) using autocatalytic hydrolysis: A biorefinery approach. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 173-180, 2016.

METROHM - **The Column Program 2018**. Disponível em <https://partners.metrohm.com/GetDocumentPublic?action=get_dms_document&docid=2919736> Último acesso em 21/11/2019.

MENEGOL, D.; SCHOLL, A. L.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. Influence of different chemical pretreatments of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) used as a substrate for cellulase and xylanase production in submerged cultivation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 9, p. 1455–1464, 2016.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522–550, 2012. Elsevier Ltd.

MERCK-MILLIPORE. **Protein Concentration and Diafiltration by Tangential Flow Filtration**. Comunicado Técnico (*Brief Technical*). 2003. Disponível em: <www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-JP-Site/ja_JP/-/JPY/ShowDocument-Pronet%3Fid%3D201306.15622+&cd=15&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br&client=firefox-b-ab> Acesso em 20 out 2018.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MILLIPORE-SIGMA. **Cellulase, enzyme blend**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/SAE0020?lang=en®ion=US&gclid=Cj0KCQjwpPHoBRC3ARIsALfx-_JZGaOJ-YVEmj_TiDFhxUYbyncMLy9atOCt_L9ShsY1QDF-3mXno2QaAtdSEALw_wcB>. Acesso em 03 de julho de 2019a.

MILLIPORE-SIGMA. **Cellulase from *Trichoderma reesei* aqueous solution, ≥700 units/g**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c2730?lang=en®ion=US&cm_sp=Insite-_-prodRecCold_xviews-_-prodRecCold3-1>. Acesso em 03 de julho de 2019b.

MILLIPORE-SIGMA. **Cellulase from *Aspergillus niger* powder, $\geq 0,3$ units/g.**

Disponível em: <

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c1184?lang=en®ion=US&cm_sp=Insite-_-prodRecCold_xviews-_-prodRecCold3-2>. Acesso em 03 de julho de 2019c.

MILLIPORE-SIGMA. **Cellulase from *Trichoderma reesei* ATCC26961 lyophilized powder, $\geq 1,0$ unit/g.** Disponível em: <

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c8546?lang=en®ion=US&cm_sp=Insite-_-prodRecCold_xviews-_-prodRecCold3-1>. Acesso em 03 de julho de 2019d.

MILLIPORE-SIGMA. **Hemicellulase from *Aspergillus niger*.** Disponível em:

<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h2125?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em 03 de julho de 2019e.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

MONTIBELLER, V. W. **Mananase: produção por via convencional e recombinante e obtenção do formulado líquido.** 2015. 166 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

MORAIS, J. P. S.; MEDEIROS, E. P.; da SILVA, J. A.; et al. Valorização de Coprodutos da Cadeia do Dendê. **Documentos 163 EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.** ISSN 2179-8184, 38p. dezembro, 2013.

Disponível em: <

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/981759/1/DOC13009.pdf> >. Último acesso em: 14 out. 2018.

MOSIER, N. S.; HALL, P.; LADISCH, C.M.; LADISCH, M. R. Reaction kinetics, molecular action, and mechanisms of cellulolytic proteins, In: SCHEPER, T. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Recent Progress in Bioconversion of lignocellulosics.** Berlim: Springer, 1999. p. 22-40.

MUKHERJEE, S. Isolation and Purification of Industrial Enzymes. In: SINGH, R. S.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. **Advances in Enzyme Technology.** Elsevier, 2019. p.41–70.

MUSSATO, S. I.; TEIXEIRA, J. A. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v. 2, p. 897-907, 2010.

NAGRAJ, A. K.; SINGHVI, M.; KUMAR, V. R.; GOKHALE, D. Optimization Studies for Enhancing Cellulase Production by *Penicillium janthinellum* Mutant EU2D-21 Using Response Surface Methodology. **BioResources**, v. 9, n. 2, 2014.

NAIDU, D. S.; HLANGOTHI, S. P.; JOHN, M. J. Bio-based products from xylan: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 28-41, 2018.

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; et al. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 355-361, 2012.

NEOH, C. H.; LAM, C. Y.; YAHYA, A.; et al. Utilization of Agro-Industrial Residues from Palm Oil Industry for Production of Lignocellulolytic Enzymes by *Curvularia clavata*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, n. 3, p. 385–390, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L.; TERMIGNONI, C. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed. 2014.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. **Angiosperms**. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68019684> > Acesso em: 15 Out 2017.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. **Areaceae** (2002). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68028023> > Acesso em: 15 Out. 2017.

NEGRULESCU, A.; PATRULEA, V.; MINCEA, M. M.; et al. Adapting the Reducing Sugars Method with Dinitrosalicylic Acid to Microtiter Plates and Microwave Heating. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 23, n. 12, p. 2176-2182, 2012.

NEVES, P. V.; PITARELO, A. P.; RAMOS, L. P. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: Effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. **Bioresource Technology**, v. 208, p. 184-194, 2016.

NORUL IZANI, M. A.; PARIDAH, M. T.; ANWAR, U. M. K.; et al. Effects of fiber treatment on morphology, tensile and thermogravimetric analysis of oil palm empty

fruit bunches fibers. **Composites Part B: Engineering**, v. 45, n. 1, p. 1251–1257, 2013.

NOVOZYMES. Application sheet – CellicCtec2 and HTec2 – Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials. 2013. Disponível em: < <http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem010/manual/Ctec2.pdf> >. Último acesso em: 19 out. 2018.

NUNES, C. S.; PHILIPPS-WIEMANN, P. Formulation of enzymes. In: NUNES, C. S.; KUMAR, V. **Enzymes in Human and Animal Nutrition**. London: Academic Press, p.429–440, 2018. Elsevier.

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

OMS – WHO – Organização Mundial de Saúde. **Concise International Chemical assessment Document 26**. 2000. Disponível em : < http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/cicad26_rev_1.pdf >. Último acesso em: 20 out. 2018.

ORTEGA, N.; DE DIEGO, S.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M. D. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 209–217, 2004.

ORWA, C.; JAMNADASS, R. H.; KINDT, R.; et al., A.- WORLD AGROFORESTRY CENTRE (2009). **Agroforestry database: a tree species reference and selection guide version 4.0**. < Disponível em: http://www.worldagroforestry.org/treedb/AFTPDFS/Elaeis_guineensis.PDF >. Acesso em: 15 Out. 2017.

Le PAGE, M. Forget food, it's in your car. **New Scientist**. p. 22-24, M1ay, 2018.

PALM OIL WORLD. **Environmental Impact**. Disponível em: < <http://www.palmoilworld.org/environment.html> > Último acesso em: 08 Out. 2018.

PALMPEDIA. *Elaeis guineensis*. Disponível em: < http://www.palmpedia.net/wiki/Elaeis_guineensis >. Acesso em: 19 fev. 2018.

PARNTHONG, J.; KUNGSANANT, S.; CHAVADEJ, S. The Influence of Nonionic Surfactant Adsorption on Enzymatic Hydrolysis of Oil Palm Fruit Bunch. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2018.

PATHAK, P.; BHARDWAJ, N. K.; SINGH, A. K. Production of Crude Cellulase and Xylanase from *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and Its Application in Photocopier Waste Paper Recycling. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 3776-3797, 2014.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. **Biometrika Trust - Oxford Journals - Oxford University Press**, v. 33, n. 4, p. 305-325, 1946.

PEREIRA, J. DE C.; GIESE, E. C.; MORETTI, M. M. DE S.; et al. Effect of Metal Ions, Chemical Agents and Organic Compounds on Lignocellulolytic Enzymes Activities. In: M. Senturk (Org.); **Enzyme Inhibitors and Activators**, 2017

PETRUCCIOLI, M.; RAVIV, M.; DI SILVESTRO, R. ; DINELLI, G. Agriculture and Agro-Industrial Wastes, Byproducts, and Wastewaters: Origin, Characteristics, and Potential in Bio-Based-Compounds Production. In: MOO-YOUNG, M. **Comprehensive Biotechnology**, v. 6: Environmental Biotechnology and Safety. 2nd Edition, p. 531-545, 2011.

PIARPUZÁN, D.; QUINTERO, J. A.; CARDONA, C. A. Empty fruit bunches from oil palm as a potential raw material for fuel ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 1130-1137, 2011.

PILATE, G.; DEJARDIN, A.; LEPLE, J. Field Trials with Lignin-Modified Transgenic Trees. In: JACQUOT, J.; GADAL, P. **Advances in Botanical Research**, v. 61, **Lignins: Biosynthesis, Biodegradation and Bioengineering**. Oxford: Academic Press – Elsevier. (2012). 421 p.

POLETTI, P.; DA ROCHA RENOSTO, D.; BALDASSO, C.; et al. Activated charcoal and microfiltration as pretreatment before ultrafiltration of pectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. **Separation and Purification Technology**, v. 151, p. 102–107, 2015.

PORTO, T. S.; PORTO, C. S.; CAVALCANTI, M. T. H.; et al. Kinetic and Thermodynamic Investigation on Ascorbate Oxidase Activity and Stability of a *Cucurbita maxima* Extract. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 6, p. 1637–1642, 2006.

PUBCHEM. **Potassium dihydrogen phosphate**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/516951>>. Acesso em: 4/12/2019.

QI, H. **Novel Functional Materials Based on Cellulose**. Cham: SpringerBrief in Applied Sciences and Technology. (2017). 92 p.

RABELO, S.; ANDRADE, R. R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, v. 136, p. 349-357, 2014.

RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 83–91, 2016.

RAGHUWANSHI, S.; DESWAL, D.; KARP, M.; KUHAD, R. C. Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. **Fuel**, v. 124, p. 183-189, 2014.

RAHMAN, M. A.; MØLLER, H. B.; SAHA, C. K.; et al. Anaerobic co-digestion of poultry droppings and briquetted wheat straw at mesophilic and thermophilic conditions: Influence of alkali pretreatment. **Renewable Energy**, v. 128, p. 241–249, 2018.

RAJAN, K.; CARRIER, D. J. Effect of dilute acid pretreatment conditions and washing on the production of inhibitors and on recovery of sugars during wheat straw enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 62, p. 222–227, 2014.

RAJAKARI, K.; HOTAKAINEN, K.; MYLLARINEN, P. **Liquid enzyme formulation and a process for its preparation**. US Patents. Number: US20140287098A1. Disponível em: <<https://patentimages.storage.googleapis.com/7b/0e/05/fe0e5622028ad0/US20140287098A1.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2018.

RAJENDRAN, K.; DRIELAK, E.; VARMA, V. S. ; et al. Updates on the pretreatment of lignocellulosic feedstocks for bioenergy production – a review. **Biomass. Conv. Bioref.**, June 2017. DOI: 10.1007/s13399-017-0269-3.

RAJU, P. S.; BAWA, A. S. Food Additives in Fruit Processing. In: HUI, Y. H. **Handbook of Fruits and Fruit Processing**. Ames: Blackwell Publishing, p. 145-170, 2006.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, p. 101–109, 2012.

RASHID, M. H.; SIDDIQUI, K. S. Thermodynamic and kinetic study of stability of the native and chemically modified β -glucosidases from *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 109–115, 1998.

RASOULNIA, P.; MOUSAVI, S. M. Maximization of organic acids production by *Aspergillus niger* in a bubble column bioreactor for V and Ni recovery enhancement from power plant residual ash in spent-medium bioleaching experiments. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 729–736, 2016.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. **Bioresource technology**, v. 199, p. 92–102, 2016. Elsevier Ltd.

RÄTTÖ, M.; POUTANEN, K. Production of mannan-degrading enzymes. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 9, p. 661–664, 1988.

RAWAT, R.; SRIVASTAVA, N.; CHADHA, B. S.; OBEROI, H. S. Generating Fermentable Sugars from Rice Straw Using Functionally Active Cellulolytic Enzymes from *Aspergillus niger* HO. **Energy & Fuels**, v. 28, n. 8, p. 5067–5075, 2014.

ROCHA, N, F. A. R.; BARROS, M. A.; FISCHER, J.; et al. Ethanol production from agroindustrial biomass using a crude enzyme complex produced by *Aspergillus niger*. **Renwable Energy**, v. 57, p. 432-435, 2013.

ROOPAN, S. M. An overview of natural renewable bio-polymer lignin towards nano and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 508-514, 2017.

ROSMINE, E.; SAINJAN, N. C.; SILVESTER, R.; et al. Statistical optimisation of xylanase production by estuarine *Streptomyces* sp. and its application in clarification of fruit juice. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 393–401, 2017.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6. ed ed. London: APHA, (PhP) Pharmaceutical Press, 2009.

ROYCE, J.; LIDERFELT, J.; ROBINSON, C. Filtration Methods for Use in Recovery Processes. In: JAGSCHIES, G.; LINDSKOG, E.; LACKI, K.; GALLIHER, P. **Biopharmaceutical Processing**. Elsevier. p. 295–315, 2018.

SAINI, R.; SAINI, J. K.; ADSUL, M.; et al. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. **Bioresource Technology**, p. 240-246, 2015.

SAFARI, A.; KARIMI, K.; SHAFIEI, M. Dilute alkali pretreatment of softwood pine: A biorefinery approach. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 67–76, 2017.

SAJITH, S.; SREEDEVI, S.; PRIJI, P.; et al. Production and partial purification of cellulase from a novel fungus, *Aspergillus flavus* BS1. **Ann. Microbiol**, v. 64, p. 763-771, 2014.

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. **3,5-Dinitrosalicylic acid – Material Safety Data Sheet**. Disponível em: <<http://datasheets.scbt.com/sc-214181.pdf>> Acesso em: 17 fev. 2018.

dos SANTOS, A. A.; DEOTI, J. R.; MÜLLER, G.; et al. Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.

SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 641–646, 2010.

SARI, A. A.; KURNIAWAN, H. H.; NURDIN, M.; ABIMANYU, H. Decolorization of Black Liquor Wastewater Generated from Bioethanol Process by Using Oil Palm Empty Fruit Bunches. **Energy Procedia**, v. 68, p. 254–262, 2015. Elsevier B.V.

SATHYA, T. A.; KHAN, M. Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in food industry. **Concise Reviews in Food Science**, v. 79, n. 11, 2014.

SAXENA, I. M.; BROWN JR, R. M. Cellulose Biosynthesis: Current views and evolving concepts. **Annals of Botany**, v. 96, p. 9-21, 2005.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263-289, 2010.

SCHNEIDER, W. D. H.; DOS REIS, L.; FONTANA, R. C.; et al. Exploring strategies for the use of glycerol in the production of cellulases and xylanases, and the use of these enzymes in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 114–118, 2018

SCHMIDELL, W.; FACCIOTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. DE A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Blucher, 2001.

SEADER, J. D.; HENLEY, E. J.; ROPER, D. K. **Separation process principles: chemical and biochemical operations**. 3rd ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2011.

SHAHABAZUDDIN, M.; SARAT CHANDRA, T.; MEENA, S.; et al. Thermal assisted alkaline pretreatment of rice husk for enhanced biomass deconstruction and enzymatic saccharification: Physico-chemical and structural characterization. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 199–206, 2018.

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. Elsevier Ltd.

SHARMA, B.; AGRAWAL, R.; SINGHANIA, R. R.; et al. Untreated wheat straw: Potential source for diverse cellulolytic enzyme secretion by *Penicillium janthinellum* EMS-UV-8 mutant. **Bioresource Technology** V. 196, p. 518-524, 2015.

SHARMA, G.; RATH, G.; GOYAL, A. Improved Biological Activity and Stability of enzyme L-Asparaginase in Solid Lipid Nanoparticles Formulation. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 2-s, p. 325–329, 2019

SHARMA, R.; RAWAT, R.; BHOGAL, R. S.; OBEROI, H. S. Multi-component thermostable cellulolytic enzyme production by *Aspergillus niger* HN-1 using pea pod waste: Appraisal of hydrolytic potential with lignocellulosic biomass. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 696-704, 2015.

SHARMA, S.; BAJAJ, B. K. Xylanase production from a new strain of *Aspergillus terreus* S9 and its application for saccharification of rice straw using combinatorial approach. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 37, n. 3, p. 1210–

1219, 2018.

SCHROYEN, M.; VERVAREN, H.; VANDEPITTE, H.; et al. Effect of enzymatic pretreatment of various lignocellulosic substrates on production of phenolic compounds and biomethane potential. **Bioresource Technology**, v.192, p. 696-702, 2015.

SHUKLA, K. K.; BADGUJAR, S. B.; BHANUSHALI, P. B.; SABHARWAL, S. G. Simplified purification approach of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin by tangential flow filtration and ion exchange chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1051, p. 68–74, 2017.

SIDIK, D. A. B.; NGADI, N.; AMIN, A. S. Optimization of lignin production from empty fruit bunch via liquefaction with ionic liquid. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 690-696, 2013.

SIEVERS, D. A.; KUHN, E. M.; TUCKER, M. P.; MCMILLAN, J. D. Effects of dilute-acid pretreatment conditions on filtration performance of corn stover hydrolyzate. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 474–480, 2017.

SIGOILLOT, J.; FAULDS, C.; Second Generation Bioethanol. In: SOCCOL, C. R.; BRAR, S. K.; FAULDS, C.; RAMOS, L. P. **Green Fuels Technology**. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. p. 213-239.

da SILVA, A. S.; INOUE, H.; ENDO, T.; et al. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7402-7409, 2010.

SIMEDARBY Plantation – **Palm Oil Facts and Figures**. Disponível em: < http://www.simedarby.com/upload/Palm_Oil_Facts_and_Figures.pdf >. Acesso em: 09 Nov de 2015.

SIMPSON, M. G. **Plant Systematics**. 2nd ed. Oxford: Academic Press – Elsevier. 752 p. 2010.

SIMPSON, R. J. Stabilization of Proteins for Storage. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2010, n. 5, 2010.

SINGH, R.; PURKAIT, M. K. Microfiltration Membranes. In: ISMAIL, A. F.; RAHMAN, M. A.; OTHMAN, M. H. D.; MATSUURA, T. **Membrane Separation Principles and Applications**. Elsevier, p.111–146, 2019.

SINGH, R. S.; CHAUHAN, K.; PANDEY, A. Influence of aeration, agitation and process duration on fungal inulinase production from paneer whey in a stirred tank reactor. **Bioresource Technology Reports**, v. 8, p. 100343, 2019.

SINGH, S.K.; RATHORE, N.; MCAULEY, A.; RATHORE, A. S. Best Practices for Formulation and Manufacturing of Biotech Drug Products. **BioPharm. International**, n. 22, v. 6, 2009.

SINGHANIA, R. R.; SAINI, R.; ADSUL, M.; et al. Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *Penicillium janthinellum* cellulases. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 490-495, 2014.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541–549, 2010.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; RAJASREE, K. P.; et al. Properties of a major β -glucosidase-BGL1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1521–1524, 2011.

SIQUEIRA, J. G. W.; RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; et al. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, p. 105419, 2020a.

SIQUEIRA, J. G. W.; TEIXEIRA, N. A.; VANDENBERGHE, L. P. S.; et al. Update and Revalidation of Ghose's Cellulase Assay Methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2020b. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12010-020-03291-0>>. Acesso em: 24/2/2020.

SITI AISYAH, M. S.; UEMURA, Y.; YUSUP, S. The Effect of Alkaline Addition in Hydrothermal Pretreatment of Empty Fruit Bunches on Enzymatic Hydrolysis Efficiencies. **Procedia Chemistry**, v. 9, p. 151–157, 2014. Elsevier Ltd.

SIVASANGAR, S.; ZAINAL, Z.; SALMIATON, A.; TAUFIQ-YAP, Y. H. Supercritical water gasification of empty fruit bunches from oil palm for hydrogen production. **Fuel**, v. 143, p. 563–569, 2015.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry: fundamentals and applications**. 2nd ed. San Diego: Academic Press. 1993. 298 p.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; et al. (NREL – National Renewable Energy Laboratory). **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**. Golden, 2008. Technical Report.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Article in Press, 2017.

SOCCOL, C. R.; FARACO, V.; KARP, S.; et al. Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Future Perspectives. In: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; DUSSAP, C. G.; GNANSOUNOU, E. **Biofuels**. 1 ed. Oxford : Academic Press, 2011. p. 101-122.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820-4925, 2010.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. 2017.

STUDENT. The probable error of a mean. **Biometrika**, v. 6, n. 1, p. 1-25, 1908.

SUDIYANI, Y.; STYARINI, D.; TRIWAHYUNI, E.; et al. Utilization of Biomass Waste Empty Fruit Bunch Fiber of Palm Oil for Bioethanol Production Using Pilot–Scale Unit. **Energy Procedia**, v. 32, p. 31–38, 2013. Elsevier B.V.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial Cellulases - Production, applications and challenges. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 64, p. 832-844, 2005.

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.

SUMNER, J. B.; SOMERS, G. F. **Laboratory Experiments in Biological Chemistry**. New York: Academic Press, 1944.

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

TAN, L. ; WANG, M. ; LI, X. ; et al. Fractionation of oil palm empty fruit bunch by bisulfite pretreatment for the production of bioethanol and high value products. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 572-578, 2016.

TAN, L.; YU, Y.; LI, X.; et al. Pretreatment of empty fruit bunch from oil palm for fuel ethanol production and proposed biorefinery process. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 275–282, 2013.

THE WORLD BANK – **Fossil fuel energy consumption (% of total) | Data.**

(2014a). Disponível em:

<<https://data.worldbank.org/indicator/EG.USE.COMM.FO.ZS?end=2015&start=1960&view=chart>>. Acesso em 07 out. 2017.

THOMAS, L.; PARAMESWARAN, B.; PANDEY, A. Hydrolysis of pretreated rice straw by an enzyme cocktail comprising acidic xylanase from *Aspergillus* sp. for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 98, p. 9-15, 2016.

UBHAYASEKERA, W.; MUÑOZ, I. G.; VASELLA, A.; et al. Structures of Phanerochaete chrysosporium Cel7D in complex with product and inhibitors. **FEBS Journal**, v. 272, p. 1952-1964, 2005

UFOP – UNION ZUR FÖRDERUNG VON OEL – UND PROTEINPFLANZEN. **UFOP report on Global Market Supply 2017/2018 – European and World demand for biomass for the purpose of biofuel production in relation to supply in the food and feedstuff markets.** Germany, 2017.

VASCONCELLOS, V. M.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. L. C.; FARINAS, C. S. Addition of metal ions to a (hemi)cellulolytic enzymatic cocktail produced in-house improves its activity, thermostability, and efficiency in the saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **New Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 331–337, 2016.

VASCONCELLOS, V. M.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. L. C.; FARINAS, C. S. Production efficiency versus thermostability of (hemi)cellulolytic enzymatic cocktails from different cultivation systems. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1701–1709, 2015.

VIIKARI, L. Lignocellulose Modifying Enzymes for Sustainable Technologies. In: MANSFIELD, S. D.; SADDLER, J. N. **Applications of Enzymes to Lignocellulosics**. Washington: American Chemical Society. 2003.467 p.

WAN, C.; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1447–1457, 2012.

WATANABE, T. Introduction: Potential of Cellulosic Ethanol. In: FARACO, V. **Lignocellulose Conversion - Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production**. Berlin: Springer-Verlag. 2013. p. 1-20.

WERTZ, J.; BÉDUÉ, O. **Lignocellulosic Biorefineries**. Lausanne: EPFL Press. 2013. 540 p.

WILSON, D. B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 259-263, 2011.

WWF – World Wide Fund for Nature. **Palm Oil Investor Review: Investor Guidance on Palm Oil - The role of investors in supporting the development of a sustainable palm oil industry**. (2012). Disponível em: < awsassets.panda.org/downloads/wwf_palmoil_investorreview.pdf > Acesso em: 10 Nov 2015.

YADIRA, P. B.; SERGIO, S.; FERNANDO, S. E. L.; SEBASTIAN, P. J.; EAPEN, D. Bioethanol production from coffee mucilage. **Energy Procedia**, v. 57, p. 950-956, 2014.

YAMAN, S. Pyrolysis of biomass to produce fuels and chemical feedstocks. **Energy Conversion and Management**, v. 45, p. 651-671, 2004.

YANG, L.; YAN, S.; ZHANG, Y.; et al. Novel enzyme formulations for improved pharmacokinetic properties and anti-inflammatory efficacies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 537, n. 1–2, p. 268–277, 2018.

YING, T. Y.; TEONG, L. K.; ABDULLAH, W. N. W.; PENG, L. C. The Effect of Various Pretreatment Methods on Oil Palm Empty Fruit Bunch (EFB) and Kenaf Core Fibers for Sugar Production. **Procedia Environmental Sciences**, v. 20, p. 328–335, 2014.

YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Fungal solid-state

fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.

YU, H.; LI, X. Alkali-stable cellulase from a halophilic isolate, *Gracilibacillus* sp. SK1 and its application in lignocellulosic saccharification for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 85, p. 19-25, 2015

YU, Q.; LIU, J.; ZHUANG, X.; et al. Liquid hot water pretreatment of energy grasses and its influence of physico-chemical changes on enzymatic digestibility. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 265–270, 2016.

YUNUS, R.; SALLEH, S. F.; ABDULLAH, N.; BIAK, D. R. A. Effect of ultrasonic pretreatment on low temperature acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9792-9796, 2010.

YUSOFF, S. Renewable energy from palm oil – innovation on effective utilization of waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, n. 1, p. 87–93, 2006.

ZACCARIA, S.; BOFF, N. A.; BETTIN, F.; DILLON, A. J. P. Use of micro- and ultrafiltration membranes for concentration of laccase-rich enzymatic extract of *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 and application in dye decolorization. **Chemical Papers**, 2019.

ZAKARIA, M. R.; HIRATA, S.; HASSAN, M. A. Hydrothermal pretreatment enhanced enzymatic hydrolysis and glucose production from oil palm biomass. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 142–148, 2015.

ZAMANI, A. Introduction to Lignocellulose-based Products. In: KARIMI, K. **Lignocellulose-based products**. Switzerland: Springer International Publishing. 2014.p. 2-36.

ZANIRUN, Z.; BAHRIN, E. K.; LAI-YEE, P.; et al. Enhancement of fermentable sugars production from oil palm empty fruit bunch by ligninolytic enzymes mediator system. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p. 13–20, 2015.

ZHANG, D.; ONG, Y. L.; LI, Z.; WU, J. C. Optimization of dilute acid-catalyzed hydrolysis of oil palm empty fruit bunch for high yield production of xylose. **Chemical Engineering Journal**, v. 181-182, p. 636–642, 2012.

ZHANG, H.; SANG, Q. Production and extraction optimization of xylanase and β -

mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. **Biochemical Engineering Journal**, v. 97, p. 101–110, 2015.

ZHANG, K.; PEI, Z.; WANG, D. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 21–33, 2016.

ZHANG, X.; ZHANG, Y. P. Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. In: YANG, S.; EL-ENSHASY, H. A.; THONGCHUL, N. **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2013. p. 131–146.

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

ZHAO, C.; XIE, B.; ZHAO, R.; FANG, H. Microbial oil production by *Mortierella isabellina* from sodium hydroxide pretreated rice straw degraded by three-stage enzymatic hydrolysis in the context of on-site cellulase production. **Renewable Energy**, v. 130, p. 281–289, 2019.

ZHAO, C.; ZOU, Z.; LI, J.; et al. Efficient bioethanol production from sodium hydroxide pretreated corn stover and rice straw in the context of on-site cellulase production. **Renewable Energy**, v. 118, p. 14–24, 2018.

ZHUANG, X.; WANG, W.; YU, Q.; et al. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 68–75, 2016.

ZOU, H.; DING, S.; ZHANG, W.; et al. Study on Influence Factors in *Bacillus Thuringiensis* Production by Semi-solid State Fermentation Using Food Waste. **Procedia Environmental Sciences**, v. 31, p. 127–135, 2016.