

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA**

FELIPE RAVACHE MEGER

**PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS E OLIGOSSACARÍDEOS
PREBIÓTICOS A PARTIR DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS
LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CURITIBA
2016**

FELIPE RAVACHE MEGER

**PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS E OLIGOSSACARÍDEOS
PREBIÓTICOS A PARTIR DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS
LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica do Departamento de Química e Biologia – DQBI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. José Domingos Fontana

Coorientadora: Dra. Marcela Tiboni

**CURITIBA
2016**

FELIPE RAVACHE MEGER

**PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS E OLIGOSSACARÍDEOS
PREBIÓTICOS A PARTIR DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS
LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA TECNOLÓGICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – Prof. Dr. Pedro Ramos da Costa Neto
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Membro 2 – Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Orientador – Dr. José Domingos Fontana
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Coordenadora de Curso – Profa. Dra. Danielle Caroline Schnitzler

Curitiba, 18 de novembro de 2016.

*Assim como tanto me empenhei para
realização deste trabalho, dedico os frutos e méritos
que agora colho àqueles que sempre dedicaram a
mim todas suas forças.*

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao professor Dr. José Domingos Fontana pela brilhante orientação e grandiosa oportunidade de aprendizagem. Pelos ensinamentos e até pelas chamadas de atenção que fizeram com que eu amadurecesse durante o desenvolvimento desta pesquisa e pelos momentos de descontração que renderam boas risadas e uma longa amizade.

Com a mesma admiração e respeito, agradeço a minha coorientadora Dra. Marcela Tiboni por ter aceito o convite de me auxiliar nesta missão. Sou grato pela paciência e prontidão com que respondia as minhas dúvidas e pela disciplina com que sempre me ensinou a realizar minhas tarefas, sem esquecer de todas as suas indicações teóricas que são o corpo deste projeto.

Agradeço também ao grupo do LQBB em especial ao Lucas Scremin - que me ensinou as etapas preparatórias da redação desta pesquisa e sanou algumas das minhas dúvidas; à Heide Koop – que me ajudou a finalizar determinada etapa deste trabalho e auxiliando na pesquisa teórica com importante referências. Ao próprio laboratório por disponibilizar de recursos e equipamentos para o desenvolver desta pesquisa.

Com todo meu amor agradeço minha mãe Adriana de Fátima Ravache Meger que nunca poupou esforços para minha educação. Que sempre me ensinou limites e valores, como integridade, honestidade e justiça. E, que com toda sua determinação e insistência esteve ao meu lado em todos os momentos fossem eles bons ou ruins.

Ao meu pai Edilson José Meger, agradeço incansavelmente por todo apoio que sempre encontrei em seus conselhos. Agradeço por ser a minha inspiração de princípios de vida. Sua paciência e compreensão sempre me mantiveram calmos e motivados para nunca desistir, mantendo-me determinado.

Agradeço a Marina Pranke Cioato que me incentivou no decorrer deste trabalho, que me apoio e compreendeu nos momentos difíceis, que me descontrau e relaxou minha mente com várias risadas e danças.

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, por ter durante o curso dado condições de desenvolvimento pessoal e acadêmico.

Ao Wagner Spirandelli por ter cedido como cortesia a matéria-prima de toda pesquisa através da CLASPAR/CODAPAR (Secretaria de Agricultura do Paraná).

Por fim, mas não menos importante, deixo meus agradecimentos a todos os amigos e familiares que direta ou indiretamente também participaram me incentivando e motivando a dar continuidade as minhas atividades acadêmicas.

Muito Obrigado!

RESUMO

MEGER, Felipe R. **Produção de biocombustíveis e oligossacarídeos prebióticos a partir de resíduos agrícolas ligno(hemi)celulósicos**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Química Tecnológica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

O bioetanol e outros combustíveis celulósicos são *commodities* energéticas a partir de fontes renováveis de fitobiomassas e têm potencial para substituir os combustíveis derivados do petróleo. Uma das formas mais contemporâneas de obtenção do bioetanol é utilizando resíduos ligno(hemi)celulósicos como matéria-prima. Uma boa fonte desses materiais são as fitobiomassas residuais da agricultura (e.g. casca de trigo, casca de soja, bagaço de cana e quimicamente similares) encontrados em abundância devido à extensão e influência econômica dentro da prática agrícola brasileira. Para que tais materiais, como a casca de trigo e a casca de soja possam ser utilizados na produção de biocombustíveis, é necessário um processo de pré-tratamento, preferencialmente da classe dos ácidos mais brandos, para melhor aproveitar os carboidratos das duas frações dominantes: celulose e hemicelulose. Foi dada preferência ao pré-tratamento fosfórico diluído (H_3PO_4 em pH efetivo na faixa de pH de 2 a 3 e, portanto, 5 – 25 mmol/L) – hidrólise fosfórica, combinado a termopressurização moderada (159 – 180°C = 5 a 9 atm). Tal faixa permite tanto administrar a hidrólise completa ou liberação otimizada de pentoses das hemicelulose quanto parcializá-la na direção de xilo oligossacarídeos, já, *per se*, com propriedades prebióticas e ainda paralelamente, solubilizar a lignina, portanto, também favorecendo a ulterior hidrólise enzimática da celulose residual. A metodologia analítica basal foi a cromatografia, tanto em camada delgada (CCD) quanto líquida de alto desempenho (CLAE). As melhores condições de pré-tratamento com ácido O-fosfórico com intuito de elevar o poder de sacarificação das biomassas e assim a produção de etanol, para a casca de trigo foi de 7 atm e pH 3, obtendo um alto teor de porcentagem de hidrólise de 36,8%; para casca de soja de 5 atm nos três pH (2, 2,5 e 3), obtendo em média de 50 – 55 %. Já para uma alta liberação de oligossacarídeos na fração solúvel, a melhor condição foi de 7 atm e pH 3, tendo como a casca de trigo um resíduo agrícola com maior concentração comparado a casca de soja. Para a fermentação alcoólica, a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* mostrou-se mais eficiente na produção de etanol em menos tempo de experimento, nas melhores condições, na faixa de 8 μ L/mL, comparada a cepa de *Pichia stipitis*.

Palavras-chaves: Casca de Soja. Casca de Trigo. Pré-tratamento. Hidrólise fosfórica. Termopressurização.

ABSTRACT

MEGER, Felipe R. **Production of biofuels and prebiotic oligosaccharides from ligno (hemi) cellulosic agricultural residues.** 2016. Final Paper – Bachelor Degree in Technological Chemistry, Federal University of Technology Paraná, Curitiba, 2016.

Bioethanol and other cellulosic fuels are energy commodities derived from renewable sources of phytobiomasses with the potential to replace petroleum-based fuels. One of the most contemporary ways of obtaining bioethanol is by using ligno(hemi)cellulosic residues as feedstock. One good source of these materials are the residual agricultural phytobiomasses (e.g. wheat husk, soybean hull, cane bagasse and chemically similar) found in abundance in Brazil due to the extent and economic influence of the agricultural practice in the country. In order to use these materials – such as the wheat husks and the soybean hulls – to produce biofuels, it is required a pretreatment process, preferably of the milder acid class, to seize the carbohydrates of the two dominant fractions: Cellulose and hemicellulose. In this final paper, preference was given to dilute phosphoric pretreatment (H_3PO_4 at pH effective in the pH range of 2 to 3 and therefore 5 - 25 mmol / L) - phosphoric hydrolysis, combined with moderate thermopressurization (159 - 180 ° C = 5 to 9 atm). This range allows not only to adhere to the complete hydrolysis or to optimize the release of hemicellulose pentoses but also to direct it in the direction of xylos oligosaccharides, already, per se, with prebiotic properties; and it also allows in parallel to solubilize the lignin, consequently benefiting the enzymatic hydrolysis of the residual cellulose. The methodology analytical baseline was the chromatography, in both thin layer (CCD) and high performance liquid (HPLC). The best pretreatment conditions with O-phosphoric acid in order to increase the saccharification power of the biomasses and thus the ethanol production for the wheat husk was of 7 atm and pH 3, obtaining a high content of hydrolysis percentage of 36.8%; For soybean hulls of 5 atm in the three pH (2, 2,5 and 3), obtaining on average 50 - 55%. However, for a high release of oligosaccharides in the soluble fraction, the best condition was 7 atm and pH 3, with the wheat husk being an agricultural residue with a higher concentration compared to soybean hulls. For the alcoholic fermentation, the *Saccharomyces cerevisiae* strain was more efficient in the production of ethanol in less time of experiment, in the best conditions, in the range of 8 μ L/mL, compared to the strain of *Pichia stipitis*.

Keywords: Soybean Hull. Wheat Husk. Pre-treatment. Phosphoric hydrolysis. Thermopressurization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura da biomassa ligno(hemi)celulósica.	19
Figura 2 – Estrutura molecular da celulose.	20
Figura 3 – Estrutura da Arabinoxilana.....	22
Figura 4 – Estrutura da Galactoglucomanana.	22
Figura 5 – Estruturas moleculares dos Álcoois Precusores das estruturas básicas da lignina.	23
Figura 6 – Diagrama da conversão da matéria ligno(hemi)celulósica para etanol e oligossacarídeos.	31
Figura 7 – Etapas da fermentação alcoólica, partindo da glucose até o produto final, o etanol.	32
Figura 8 – Estrutura de xiloses e xilo-oligossacarídeos.....	34
Figura 9 – Algumas formas de hidrolises ou pré-tratamento para produção dos Xilo-oligossacarídeos a partir dos resíduos ligno(hemi)celulósicos.	35
Figura 10 – Reator de Termopressurização para realização do pré-tratamento fosfórico.	39
Figura 11 – Esquema de filtração das biomassas pós pré-tratamento com ácido O-fosfórico diluído e termopressurizado.	40
Figura 12 – Equação da reação de redução do Ácido 3,5-dinitrosalicílico.	42
Figura 13 – Equação da reação de determinação de Açúcares Totais.....	43
Figura 14 – Foto da casca de trigo e soja trituradas e tamisadas em diferentes granulometrias.	48
Figura 15 – Foto das cinzas das cascas de trigo e soja, no qual foram obtidas com auxílio da Mufla a 800°C durante 4 horas.	51
Figura 16 – Resultado do teste cromatográfico para identificação de carboidratos na Casca de Soja realizada em Cromatoplaça Merck de sílica – gel 60.	52
Figura 17 - Cromatografia de Camada Delgada da cinética de tempo da Hidrólise com TFA das hemiceluloses das cascas de Soja e Trigo.	56
Figura 18 – Cromatografia de Camada Delgada realizada com os Hidrolisados (parte solúvel) do pré-tratamento O-fosfórico diluído e termopressurizado em determinadas pressões (5, 7 e 9) e pH (2, 2,5 e 3).	62
Figura 19 – Foto do crescimento das cepas, em meio de glucose, utilizadas nos experimentos de Fermentação Alcoólica.....	69
Figura 20 – Fotos das cepas utilizadas nos experimentos de Fermentação Alcoólica em Microscópio Ótico.	70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva Analítica de Solução de Lignina.....	49
Gráfico 2 – Curva Analítica de solução de xilose (mg) com sua determinada equação da reta e R ²	53
Gráfico 3 – Porcentagem de Hidrólise nas amostras de Hemicelulose A e B que foram submetidas a hidrólise ácida com TFA.	54
Gráfico 4 – Concentrações de açúcares redutores (mg/g de amostra) nas amostras analisadas em diferentes pH (2, 2,5 e 3) submetidas as pressões de 5, 7 e 9 atm.	58
Gráfico 5 – Curva Analítica de solução de xilose (µg) com sua determinada equação da reta e R ²	59
Gráfico 6 – Concentrações de açúcares totais (mg/g de amostra) nas amostras analisadas em diferentes pH (2, 2,5 e 3) submetidas as pressões de 5,7 e 9 atm.	60
Gráfico 7 – Curva Analítica de solução de glicose com sua determinada equação da reta e R ²	65
Gráfico 8 – Porcentagem de Hidrólise nas amostras analisadas em diferentes pH (2, 2,5 e 3) submetidas as pressões de 5, 7 e 9 atm, nos tempos de 48 e 96 horas.	66
Gráfico 9 – Porcentagem de Hidrólise nas cascas de trigo e soja nativa nos tempos de 48 e 96 horas.....	67
Gráfico 10 – Crescimento da <i>S. cerevisiae</i> indireto dos hidrolisados de soja e trigo durante a fase de fermentação alcoólica.	71
Gráfico 11 – Curva Analítica de Etanol em CLAE.....	72
Gráfico 12 – Concentração de etanol em decorrer do tempo (0 – 72 horas) para o hidrolisado de soja e trigo a partir da fermentação alcoólica com o microrganismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Pichia stipitis</i>	73
Gráfico 13 – Cromatograma do cultivo de <i>Pichia stipitis</i> com o hidrolisado de soja a 7 atm e pH 2,5 II. Eluição feita em cromatografia líquida de Alta eficiência (CLAE); Fase Móvel: ácido sulfúrico 8 mmol/L; Loop: 20 µL; Fluxo: 0,5 mL/min; Detector: RID.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição Química da casca de Trigo de acordo com autores literários.	25
Tabela 2 – Composição Química da casca de Soja de acordo com autores literários.	26
Tabela 3 – Planejamento fatorial 3^2 para experimentação em termopressurização fosfórica.	39
Tabela 4 – Delineamento das amostras avaliadas segundo Planejamento fatorial 3^2.	40
Tabela 5 – Soluções do Meio de Cultivo.	45
Tabela 6 – Valores de porcentagem de Celulose e Hemicelulose nas biomassas estudadas.	49
Tabela 7 – Valores de porcentagem de lignina nas cascas de soja e trigo.	50
Tabela 8 – Valores da caracterização química das biomassas estudadas.	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

Adp.	- Adaptado
AGCC	- Ácidos graxos de cadeia curta
AIE	- Agência Internacional de Energia
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APLA	- Arranjo Produtivo Local do Alcool
atm	- Atmosferas
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COASUL	- Cooperativa Agropecuária Sudoeste Ltda.
CONAB	- Companhia Nacional de Abastecimento
COS	- Celo - oligossacarídeos
CTBE	- Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol
DNS	- Ácido dinitrosalicílico
FIESP	- Federação das Indústrias do Estado de São Paulo
FOS	- Fruto - oligossacarídeos
HC	- Hemicelulose
L(h)C	- Ligno(hemi)celulose
LQBB	- Laboratório de Químio/Biotecnologia de Biomassas
oPA	- Ácido O-fosfórico
OS	- Oligossacarídeos
SNA	- Sociedade Nacional de Agricultura
TFA	- Ácido trifluoracético
TGI	- Trato Gastrointestinal
UNICA	- União da Indústria de Cana-de-Açúcar
USDA	- Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
UTFPR	- Universidade Tecnológica Federal do Paraná
XOS	- Xilo - oligossacarídeos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	155
2	OBJETIVOS	188
2.1	OBJETIVO GERAL	188
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	188
3	CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA	199
3.1	LIGNO(HEMI)CELULÓSICO	199
3.1.1	<i>Celulose</i>	20
3.1.2	<i>Hemicelulose</i>	21
3.1.3	<i>Lignina</i>	222
3.2	TRIGO	233
3.3	SOJA	255
3.4	BIOCOMBUSTÍVEL	266
3.4.1	<i>Pré-tratamento de Resíduos Ligno(hemi)celulósicos – L(h)C</i>	288
3.4.2	<i>Fermentação Alcoólica</i>	311
3.5	OLIGOSSACARÍDEOS	333
4	METODOLOGIA	366
4.1	RESÍDUOS LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS – L(H)C	366
4.1.1	<i>Caracterização das biomassas</i>	366
4.2	AMOSTRA PADRÃO PARA OS OLIGOSSACARÍDEOS	377
4.2.1	Hidrólise Ácida com Ácido Trifluoracético (TFA)	388
4.3	HIDRÓLISE COM ÁCIDO FOSFÓRICO TERMOPRESSURIZADO	388
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS	411
4.4.1	<i>Determinação dos Açúcares Redutores</i>	411
4.4.2	<i>Determinação dos Açúcares Totais</i>	422
4.4.3	<i>Cromatografia em Camada Delgada</i>	433
4.5	RESÍDUOS LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS – L(H)C INSOLÚVEIS	444
4.5.1	<i>Hidrólise Enzimática</i>	444
4.5.1.1	<i>Enzimas</i>	444
4.5.1.2	<i>Sacarificação Enzimática</i>	444
4.5.2	<i>Fermentação Alcoólica</i>	455
4.5.2.1	<i>Meio de Cultivo e Microrganismo</i>	455
4.5.2.2	<i>Fermentação alcoólica da celulose sacarificada</i>	466
4.5.2.3	<i>Crescimento Microbiano</i>	466
4.5.3	<i>Quantificação do Bioetanol</i>	477
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	488
5.1	RESÍDUOS LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS – L(H)C	488
5.1.1	<i>Caracterização da Biomassas</i>	499
5.2	AMOSTRA PADRÃO PARA OLIGOSSACARÍDEOS	522
5.3	HIDRÓLISE COM ÁCIDO FOSFÓRICO	577
5.4	CARACTERIZAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS	577
5.4.1	<i>Determinação de Açúcares Redutores</i>	57
5.4.2	<i>Determinação de Açúcares Totais</i>	59
5.4.3	<i>Cromatografia de Camada Delgada</i>	61
5.5	RESÍDUOS LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS – L(H)C INSOLÚVEIS	644
5.5.1	<i>Sacarificação Enzimática</i>	644

5.5.2	<i>Fermentação alcoólica</i>	69
5.5.2.1	<i>Meio de cultivo e microrganismos</i>	69
5.5.2.2	<i>Fermentação alcoólica da celulose sacarificada</i>	70
5.5.2.3	<i>Crescimento microbiano</i>	71
5.5.3	<i>Quantificação do Bioetanol</i>	72
6	CONCLUSÃO	766
	REFERÊNCIAS	788

1 INTRODUÇÃO

Quando o assunto é fontes enérgicas para transportes e atividades industriais, os combustíveis fósseis como petróleo, gás natural e seus derivados ainda prevalecem, sendo os mais utilizados. Segundo o levantamento de dados, de 2013, da Agência Internacional de Energia (AIE), 87% de todo o combustível mundialmente consumido é proveniente de fontes fósseis. No entanto, muitas polêmicas envolvem essas substâncias, que vão além do fato de serem mais poluentes gerando mudanças climáticas e agravamento do efeito estufa devido a sua combustão, como é o caso da finitude da reserva de petróleo e a escassez de abastecimento de determinados países.

Atualmente uma solução encontrada para resolver estes problemas é a substituição dos combustíveis fósseis por biocombustíveis como, por exemplo, o etanol. No Brasil, o consumo de etanol já representa uma proporção de um para um em relação ao de gasolina como fonte energética para transportes. Entretanto a produção, mesmo crescente deste biocombustível, não é suficiente para suprir a demanda mundial, para tanto seria necessária, primeiramente, a ampliação das áreas de cultivo das matérias-primas (cana-de-açúcar, milho, beterraba, entre outros), que hoje competem em espaço e lucro com a indústria alimentícia (CARVALHO, 2009).

Diante deste cenário, estudos e métodos estão sendo desenvolvidos buscando viabilizar outras formas para produção dos biocombustíveis. Um meio encontrado e já viabilizado no mercado, é a utilização de resíduos ligno(hemi)celulósicos agroindustriais, como: bagaço e palha de cana-de-açúcar e bagaço e palha de milho para produção de bioetanol ou etanol de 2ª. geração comparativamente ao mesmo produto obtido via a clássica fermentação de caldo de cana (sacarose). Nessa alternativa a celulólise enzimática da celulose residual pós-tratamento de ligno(hemi)celulose nativa está sendo progressivamente consolidada (SANTOS, 2012; LIMAYEM, 2012; RIGDON, 2013; ZHENG, 2014; HILPMANN, 2016). Entre as vantagens também encontradas no etanol celulósico estão que não necessita de novas áreas ou expansão de áreas antigas de cultivo – não competindo com a produção alimentícia; e utiliza resíduos, muitas vezes desperdiçados, pela agroindústria (SILVA, 2010).

A partir destes resíduos, mais especificamente das cascas de trigo e de soja (subsídios dessa pesquisa), realizou-se pré-tratamento com ácido *O*-fosfórico diluído termopressurizado (hidrólise ácida), que permite, devido ao fato de pertencer a classe dos ácidos mais brandos, uma menor degradação da fração mais lábil (até furfural ou adiante até ácido levulínico a partir da fração hemicelolósica), alcançando maior eficiência na obtenção do bioetanol. Após o pré-tratamento, a hemicelulose e lignina sofrem despolimerização, assim seus produtos de degradação são dissolvidos na parte líquida, enquanto a celulose permanece na parte sólida (BEHERA, 2014; KO, 2015), agora então numa forma alterada e mais amena à ação das enzimas celulolíticas.

Outra frente observada foi a obtenção da hemicelulose apenas parcialmente hidrolisada, solúvel (oligossacarídeos prebióticos), resultado do pré-tratamento ácido fosfórico, que está relacionada com o aumento do número de bactérias benéficas no intestino humano ou animal, portanto favorecendo o desenvolvimento bactérias úteis e inibindo aquelas potencialmente patogênicas (MOURE, 2006; RASTALL, 2010; GIESE, 2011; ZHANG, 2016).

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Químio/Biotecnologia de Biomassas (LQBB) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) que possui viabilidade e competência para tal, seguindo orientações teóricas e práticas do referencial teórico. Instituições públicas e privadas (citadas durante a fundamentação) contribuíram de forma indireta, mas não menos significativa, com a disponibilização de matéria-prima adequada para os testes e avaliações necessários. As fontes referenciais utilizadas foram principalmente os estudos desenvolvidos pelo professor José Domingos Fontana e a pesquisadora Marcela Tiboni, ambos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – no quadriênio de 2013 – 2016, juntamente com os demais orientados.

O sucesso da aplicação dos resultados da pesquisa permitirá o maior rendimento de produção de etanol a partir da fermentação das matérias-primas concomitantemente à liberação da hemicelulose então na forma de oligossacarídeos solúveis prebióticos tais como os XOS – Xilo Oligossacarídeos, do ponto de vista médico e nutricional bem reconhecidos como alimentos nutracêuticos.

De modo geral a aplicação prática deste estudo poderá determinar elevação no poder de sacarificação da biomassa insolúvel a partir de enzimas celulolíticas, promover a fermentação alcoólica de resíduos, determinar condições de pré-

tratamento termo-fosfórico e, principalmente, prospectar o aumento na destinação de resíduos agrícolas ligno(hemi)celulósicos para utilização como matéria-prima tanto na produção de biocombustíveis quanto de oligossacarídeos prebióticos considerando suas vantagens como fonte combustível e para o organismo humano, respectivamente, ao invés de sua simples e poluente combustão energética.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Conciliar a perspectiva de exploração de resíduos ligno(hemi)celulósicos, cascas de trigo e de soja, como matéria-prima de eleição para a produção tanto de biocombustíveis, como etanol, quanto de oligossacarídeos prebióticos através de pré-tratamento por termopressurização com ácido O-fosfórico diluído.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

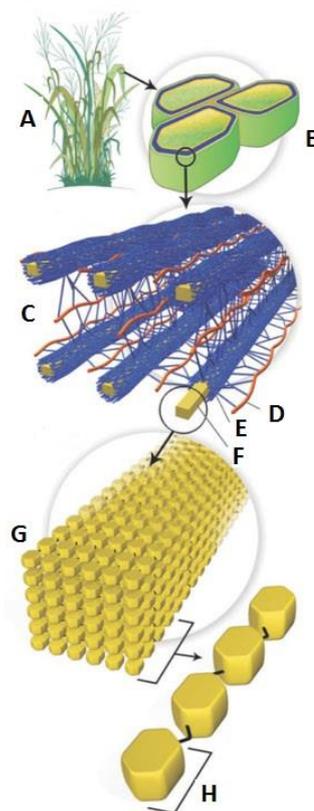
- Determinar as melhores condições de pré-tratamento por hidrólise com termopressurização utilizando ácido fosfórico diluído dos resíduos ligno(hemi)celulósicos, cascas de trigo e de soja, a fim de elevar o poder de sacarificação da biomassa insolúvel utilizando enzimas celulolíticas;
- Determinar as melhores condições de pré-tratamento termo-fosfórico que libere em sua fração líquida oligossacarídeos, e quantifica-los por métodos colorimétricos, quanto a presença de açúcares redutores pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), e de açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico além de qualifica-los por cromatografia em camada delgada (CCD);
- Promover a sacarificação enzimática do resíduo celulósico pré-tratado, utilizando um *pool* de enzimas endoglucanases e celobiohidrolases (celulases) + β -glucosidase, a fim de liberar a maior concentração de glucose livre;
- Promover a fermentação alcoólica dos resíduos celulósicos pré-tratados e sacarificados utilizando os micro-organismos *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis*; e determinar as melhores condições de produção etanólica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3 CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA

3.1 LIGNO(HEMI)CELULÓSICO

Casca de trigo, casca de soja, bagaço de cana-de-açúcar entre outros resíduos agrícolas são exemplos de materiais ligno(hemi)celulósicos – L(h)Cs. Estes são compostos por celulose, hemicelulose e lignina, e são os principais constituintes da parede celular vegetal, conforme mostrado na Figura 1. Os L(h)Cs são importantes fontes de carbono podendo ser aplicados na geração de energia renovável (OGEDA, 2010; GIRIO, 2010; FONSECA, 2011; TAKATA, 2013; ZHENG, 2014).

Figura 1 – Estrutura da biomassa ligno(hemi)celulósica.



Nota: A: Materiais ligno(hemi)celulósicos - L(h)C; B: Célula Vegetal; C: Estrutura da Parede Celular; D: Lignina (Vermelho); E: Hemicelulose (Azul); F: Celulose (Amarelo); G: Macro-Fibrilas de celulose; H: Unidade de Glucose destada de uma Micro-Fibrila.
Fonte: Adp. SANTOS (2012).

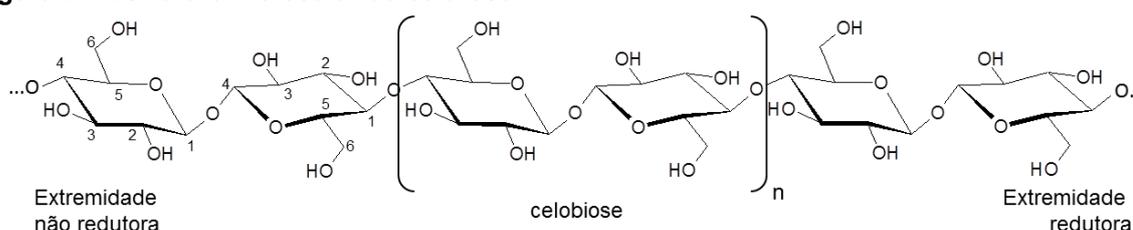
Pode-se dizer que os vegetais têm em sua constituição 40 – 50% de celulose, 20 – 30% de hemicelulose, 20 – 25% de lignina e 5 – 8% de outros extrativos, no entanto existem variações quantitativas da composição dos L(h)Cs, e organizações moleculares específicas para cada espécie (SILVA, 2009; GIRIO, 2010; FONTANA, 2013; HILPMANN, 2016). Devido a essas diferenças estruturais, a difusão de reagentes com os materiais L(h)Cs torna-se variável entre biomassas distintas. De modo geral, células vegetais com paredes poucos lignificadas são degradadas mais facilmente por enzimas hidrolíticas para polissacarídeos (GIRIO, 2010; TAKATA, 2013).

Para o máximo aproveitamento da biomassa é necessário a separação dos componentes ligno(hemi)celulósicos (lignina, hemicelulose e celulose), que se dá através de pré-processamentos à base de: ácidos ou bases, ozonólise, líquidos iônicos, hidrotermais, micro-ondas, solventes orgânicos, explosão a vapor, vias microbiológicas e métodos combinados. Esses pré-tratamentos possibilitam melhor acesso e ataque de enzimas celulolíticas à celulose residual. A partir deste processo viabiliza-se a utilização da biomassa em combustíveis e oligossacarídeos prebióticos por exemplo (KUMAR, 2008; CHU, 2011; TAKATA, 2013; ZHENG, 2014).

3.1.1 Celulose

A celulose é o componente mais abundante dos resíduos L(h)Cs. Ela é um polímero composto de unidades de β -D-glucopiranosose 1,4-ligadas em um ângulo de 180° , formando unidades de celobiose, que resultam em cadeias lineares (NELSON, 2006; ZHENG, 2014), como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 – Estrutura molecular da celulose.



Nota: Cadeia linear de β -D-glucopiranoses 1,4-ligadas. Carbonos da extremidade não-redutora numerados.

Fonte: TIBONI (2015).

Cadeias de cerca de 30 poli-celobioses entrelaçam-se em unidades maiores, as micro-fibrilas, que são estabilizadas através de múltiplas ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals com hemiceluloses, formando as fibrilas, estruturas altamente organizadas e cristalinas (LYND, 2002; FONTANA, 2004; NELSON, 2006; ZHENG, 2014). Essas fibras são compactas e insolúveis em água, embora sejam hidratáveis (SAXENA, 2001; LYND, 2002; FONTANA, 2004; TAKATA, 2013; ZHENG, 2014). Contudo, existem regiões amorfas, que são menos compactas e não cristalinas, onde é possível o ataque de enzimas celulolíticas (ROEHR, 2001; ZHENG, 2014).

3.1.2 Hemicelulose

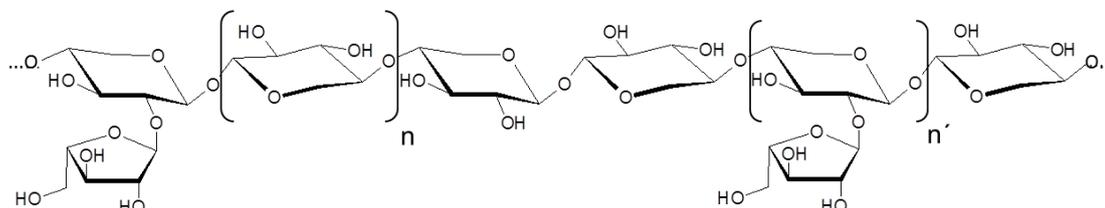
As hemiceluloses (HCs) são polissacarídeos que participam na constituição das fibrilas por interações covalentes com moléculas de lignina, conferindo rigidez à parede celular, protegendo a planta contra patógenos e ataques de micro-organismos hemi-celulolíticos (LYND, 2002; FONTANA, 2004; SANDGREN, 2005, ZHENG, 2014).

São carboidratos que possuem cadeia ramificada compostas por açúcares como aldopentoses (e.g. xilose e arabinose) e aldohexoses (e.g. glucose, manose e galactose) (BRIENZO, 2010), por vezes esterificadas também com ácidos fenólicos (e.g., ferúlico e p-coumárico), além de outros substituintes nativos como os ácidos (4-O-metil) -DF-glucurônico e acético. A composição, estrutura e resistência das HCs são variáveis, dependendo da espécie considerada — gimnospermas (madeiras duras e gramíneas) e de angiospermas (coníferas ou madeiras moles) (OGEDA, 2010). Entretanto podem ser solubilizadas por bases, variando de acordo com os sacarídeos majoritários (manose > xilose > glucose > arabinose > galactose). Assim tem-se que a HC de angiospermas, composta por cadeias de manana, sejam mais resistentes que as de gimnospermas, compostas por xilanas (HENDRIKS, 2009), porém ambas são menos resistentes à hidrólise quando comparadas à celulose.

As principais estruturas de hemiceluloses encontradas nas biomassas são compostas por heteroxilanas, facilmente substituídas por arabinose, ácidos metil-glucurônico, glucurônico e acético (arabinoxilanas, conforme Figura 3) (PÉREZ, 2010). Também as hemiceluloses compostas por 39% de cadeias de arabinoxilanas

e 61% de galactoglucomananas (manose > galactose > glucose), conforme Figura 4 (FONTANA, 1984a; CARVALHO, 2013).

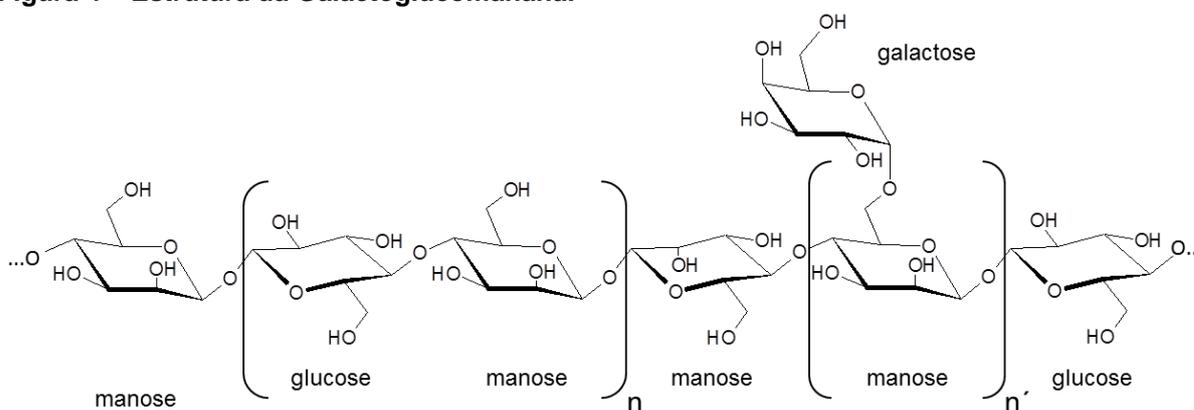
Figura 3 – Estrutura da Arabinoxilana.



Nota: Cadeia linear de β -D-xilopiranosose - ligadas com variada substituição das hidroxilas dois e três por α -L-arabinofuranose.

Fonte: TIBONI (2015).

Figura 4 – Estrutura da Galactoglucomanana.



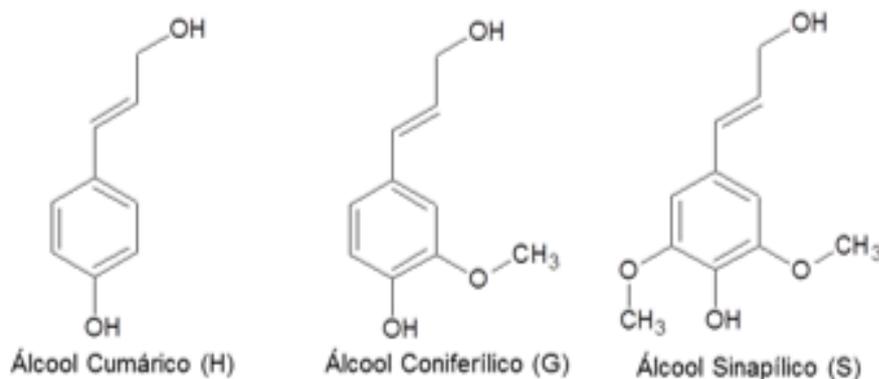
Nota: Cadeia linear de β -D-manopiranosose, intercaladas com unidades de β -D-glucopiranosose (manose > glucose) 4- ligados, além de discretas ramificações com unidades de α -D-galactopiranosose 6-ligados.

Fonte: TIBONI (2015).

3.1.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula complexa, aromática, hidrofóbica, altamente ramificada e heterogênea, composta por três estruturas básicas: a H (hidroxifenila), G (guaiacila) e S (siringila) - em arranjo polimérico e provenientes dos precursores fenilpropanóides monoméricos (álcool cumárico, coniferílico e sinapílico, respectivamente – ilustrada na Figura 5 suas determinadas estruturas moleculares) A lignina difere em resistência entre diferentes espécies vegetais devido às proporções das estruturas básicas (BOERJAN, 2003; SILVA, 2009; ZHUANG, 2012).

Figura 5 – Estruturas moleculares dos Álcoois Precusores das estruturas básicas da lignina.



Fonte: Adp. TIBONI (2015).

A lignina desempenha um papel de “cimento” para as ligações de celulose e hemicelulose, formando assim uma estrutura tridimensional rígida na parede celular (STAMATELATOU, 2012). Ela é considerada o componente mais recalcitrante da parede celular da planta, quanto maior teor de lignina maior será a resistência da biomassa para a degradação química e/ou biológica, sendo ela então a maior barreira para utilização de determinada biomassa ligno(hemi)celulósica em processos de bioconversão (ZHENG, 2014).

3.2 TRIGO

A cultura de trigo foi introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses. As primeiras produções deste cereal foram realizadas no Estado de São Paulo, sendo posteriormente transferidas para os Estados do Paraná e do Rio Grande do Sul. Hoje, cerca de 90% da produção nacional ainda se encontram nos Estados correspondentes a Região Sul do país, segundos dados apresentados no 12º levantamento da safra brasileira de grãos 2015/2016, divulgado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016).

Ainda de acordo com o Conab (2016) a produção de trigo, utilizado como alimento ou ração, deve atingir 6,164 milhões de toneladas na safra de 2016, ocupando uma área próxima a 2 mil hectares nacionais. A estimativa de exportação do trigo, segundo o Conab (2016), chega a 700 mil toneladas para o ano de 2016.

A produção de grão de trigo, cuja produção chega a ser de em torno de 6 milhões de toneladas anuais, gera resíduos que podem ser destinados a outros fins, como, por exemplo, a casca de trigo (PRÜCKLER, 2014). Pode-se considerar que metade deste resíduo em específico é passível de conversão, sendo possível com isso a produção de cerca de 600 milhões de litros de etanol no mesmo período. Além do etanol, há também grande interesse pela produção de butanol (FERREIRA-LEITAO, 2010; SCHEUER, 2011).

De acordo com os 6 milhões de toneladas de grão de trigo produzidos anualmente, 25% desse grão é denominado a casca, logo 1,5 milhões de toneladas de casca/ano. A hidrólise ácida otimizada da fração xilana é em média 20% da casca (CUI¹, 2015), então, 300 mil toneladas de xilose livre, cuja fermentação etanólica otimizada daria um rendimento esperado de 50%, assim 150 mil toneladas de “xilo”-etanol produzido por ano. A parte celulósica da casca é em média de 40% (CUI¹, 2015), 600 mil toneladas de celulose residual, que bem convertida em glucose livre gera em torno de 300 mil toneladas de etanol anualmente. Obtendo-se, pois, em média um total de 450 milhões de litros de etanol utilizando os dois principais componentes da casca de trigo.

O farelo de trigo industrial (casca de trigo triturada) normalmente é responsável por cerca de 25% do grão e consiste principalmente de amido, quantidade significativa de açúcares tais como a hemicelulose, celulose residual e outros constituintes tais como a proteína e lignina, e tem potencial para servir como matéria-prima de baixo custo para a produção de bioetanol (DAS NEVES, 2006; FAVARO, 2013). Considerando esses fatos, é promissor a introdução do farelo de trigo como um substrato para a produção de biocombustíveis, assim melhorando a situação econômica global em relação a produção de biocombustível de primeira geração (NAIR, 2015).

É de extrema importância conhecer a composição da biomassa para a produção de bioetanol, pois esta se dá através da fermentação de açúcares. A composição média da casca de trigo é de 40% de polissacarídeos de glucose (celulose), 20% xilose (hemicelulose), 16% de lignina, 9% de amido, 6% de proteína e 8% de cinzas. A tabela a seguir (Tabela 1) expõe dados literários para a composição química da casca de trigo de alguns autores e pesquisadores.

Tabela 1 – Composição Química da casca de Trigo de acordo com autores literários.

Casca de Trigo	SINGH, 2013(%)	CUI ¹ , 2015(%)	BLEDZKI, 2010(%)	Média (%)
Celulose	36	41,74	36	37,91
Hemicelulose	18	20,79	18	18,93
Lignina	16	17,39	16	16,46
Proteína	n/c	n/c	9	9
Amido	n/c	n/c	6	6
Sílica	n/c	14,8	2,1	8,4

Fonte: SINGH (2013); CUI¹ (2015); BLEDZKI (2010).

Atualmente a casca de trigo já em forma de farelo é utilizado, principalmente, como complemento de ração animal – aumentando o teor de fibras, vitaminas e proteínas, ou até em dieta alimentar humana, favorecendo no processo gastrointestinal, bem como, a eliminação de toxinas e a capacidade de absorção de líquidos, isso faz com que a sensação de saciedade perdure por muito mais tempo.

3.3 SOJA

A soja, principal oleaginosa, ocupa a quarta posição mundial entre os grãos mais consumidos e produzidos. Seu cultivo vem ganhando espaço a fim de atender as demandas dos mercados de produção de óleo, proteína de soja, de exportação e setores ligados a produtos de origem animal (ZAMBOM, 2008).

Entre os principais produtores mundiais de soja estão: Estados Unidos (principal produtor), Brasil e Argentina, de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) com dados traduzidos e apresentados pela Federação das Indústrias do Estado de São Paulo - FIESP em julho de 2016. O mesmo documento apresenta a informação de que as exportações brasileiras de soja dever atingir cerca de 59,7 milhões de toneladas no ano, volume recorde para o país.

No Brasil, a produção de soja responde por 57,02% da área cultivada no país, segundo dados do 12º levantamento da safra brasileira de grãos 2015/2016, divulgado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016) em setembro/2016. Esses dados revelam também que a soja corresponde a 51,20% do total de grãos

produzidos no país. A estimativa do Conab (2016) é que a produção de soja atinja níveis próximos a 95 milhões de toneladas (considerando safra 2015/2016).

Dentre os resíduos gerados nesta produção tem-se a casca de soja, proveniente do processo de extração do óleo. Este material representa de 7 a 8% do peso do grão. Estima-se que 3,7 milhões de toneladas deste resíduo sejam produzidos anualmente no Brasil. A composição química e energética da casca de soja possui em torno de 75% de polissacarídeos não-amiláceos, sendo 60% destes insolúveis (MOREIRA, 2009). A tabela a seguir (Tabela 2) contém dados literários da composição química média da casca de soja, que acaba dependendo do processo de descascamento da mesma, de alguns autores e pesquisadores.

Tabela 2 – Composição Química da casca de Soja de acordo com autores literários.

Casca de Soja	ROJAS, 2014(%)	CASSALES, 2011(%)	MIELLENZ, 2009(%)	Média (%)
Celulose	35,8	39,7	40	38,5
Hemicelulose	23,1	25,5	20	22,9
Lignina	9,1	9,1	8	8,7
Proteína	15,4	13	12	13,5
Pectina	4,2	n/c	10	7,1

Fonte: ROJAS (2014); CASSALES (2011); MIELLENZ (2009).

A fração de hemicelulose da casca de soja é muito rica em xilose e arabinose (arabino-xilano). Sendo em média de xilose ($18,3 \pm 1,2\%$) e de arabinose ($5,5 \pm 0,4\%$) (ROJAS, 2014).

Atualmente a casca de soja é utilizada, principalmente, na dieta alimentar humana como suplemento energético e na dieta alimentar animal como complementação de ração animal.

3.4 BIOCOMBUSTÍVEL

Combustíveis originados de matéria orgânica, proveniente de biomassa, são mundialmente conhecidos como biocombustíveis, e nesta classe destacam-se o bioetanol e o biodiesel. Estes biocombustíveis podem ser obtidos por fermentação

direta de açúcares, ou obtidos de material ligno(hemi)celulósico (composto por lignina, celulose e hemicelulose) (GALBE, 2012; ZARRINBAKHSH, 2013; BEHERA, 2014). Para o bioetanol celulósico utilizam-se restos de matéria orgânica, por exemplo, vegetal – em geral resíduos agroindustriais. Por este motivo, a produção deste combustível tem sido vista como uma forma de reaproveitamento de matéria orgânica, o que representa uma vantagem por não demandar uso de solos férteis na produção de matéria-prima, o que ocasionaria em competição com produção alimentícia (VIKARI, 2012; LOFRANO, 2013; GELFAND, 2013; LENNARTSSON, 2014). Além da sua principal utilização como combustível, o bioetanol é aplicável também aos setores de bebidas e farmacêuticos (ZANIN, 2000; VIKARI, 2012; GALBE, 2012).

Materiais L(h)C são encontrados em abundância e a baixos custos, pois são, em geral, rejeitos agroindustriais, e justamente por isso são de grande interesse para a produção de bioetanol (MCMILLAN, 1997; ROEHR, 2001; LYND, 2002; BARTLE, 2010; CHU, 2011; KELBERT, 2015). Sendo a matéria-prima barata e amplamente disponível o preço do produto final passa a ser comandado pelos custos com pré-tratamentos e enzimas fermentadoras de açúcares. Pesquisas realizadas por multinacionais (e.g. Novozymes, Genencor) revelam que o custo máximo ideal da enzima, por galão de etanol produzido, deve ser de US\$0,04.

O custo no começo de 2014 da enzima por galão de etanol chegou na faixa de US\$0,20. Ainda assim, Ricardo Blandy, líder de operações em biomassa da Novozymes para a América Latina, afirma que após realizar os descontos dos investimentos iniciais, o custo de produção de um litro de etanol celulósico ficaria abaixo do convencional (ZAPAROLLI, 2014). O Laboratório Nacional de Ciência Tecnológica do Bioetanol (CTBE) de Campinas é um dos únicos representantes no país com pesquisas avançadas na produção de enzimas locais para serem utilizadas no processo, assim barateando o método. Em novembro de 2014, o laboratório anunciou que conseguiu produzir coquetéis de enzimas ao custo de US\$ 0,10 por litro de etanol, assim tornando seu uso economicamente viável, mas necessitaria de teste em escala industrial (IBELLI, 2015).

Em março de 2015, José Geraldo Pradella, líder do projeto etanol celulósico da CTBE, afirma: “O custo das enzimas representa cerca de 20 a 25 % do custo total de produção do etanol celulósico, percentual que dificilmente será reduzido. Você pode reduzir o custo de outras coisas, como a matéria-prima, otimizar a produção de etanol, usar um pré-tratamento - que é um investimento alto - mais eficiente. Mas é

preciso haver alguns breakthroughs. De um jeito ou de outro, acabamos caindo num limite mínimo”. A CTBE junto com a Novozymes, estudam e pesquisam cada vez mais a fundo para reduzir o preço das enzimas para as indústrias (NOVACANA, 2015).

Segundo informações da União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA), Nova Cana, Celulose Online e Sociedade Nacional de Agricultura (SNA), a primeira indústria de etanol celulósico foi implementada no Estado de Alagoas, e começou a operar no ano de 2014. A indústria usa como matéria-prima: palha e bagaço de cana-de-açúcar, com capacidade de produzir até 82 milhões de litros de etanol celulósico por ano. O grupo GRANBIO, fundador da empresa, planeja investir 4 bilhões nos próximos 10 anos na construção de 12 novas usinas de etanol celulósico. Pretende-se formar novas parcerias com empresas de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, a fim de utilizar os resíduos destas para seus processos.

Conforme dados veiculados do Canal Rural, Arranjo Produtivo Local do Alcool (APLA), Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) e Jornal Cana, em São Paulo, a Raísen inaugurou sua primeira usina de etanol celulósico no ano de 2015, com capacidade de 40 milhões de litros de etanol por ano. A empresa e seus associados pretendem investir 2,5 bilhões de reais em mais oito usinas de etanol de segunda geração até 2024.

3.4.1 Pré-tratamento de Resíduos Ligno(hemi)celulósicos – L(h)C

Os resíduos ligno(hemi)celulósicos são constituídos basicamente por três tipos de componentes associados entre si: celulose, hemicelulose e lignina. O pré-tratamento tem o objetivo de separação desses constituintes, para que ocorra uma hidrólise enzimática com maior eficiência, liberando glucoses livres, assim submetida à fermentação alcoólica. Para uma boa escolha de um pré-processamento deve-se levar em conta a composição e as características da biomassa estudadas, sendo possível combinar técnicas distintas para um melhor aproveitamento. (HENDRIKS, 2009; BEHERA, 2014).

Através do pré-tratamento, de acordo com Behera *et al* (2014), é possível remover parcialmente a lignina e a hemicelulose, além de reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade da biomassa. Desse modo, o objetivo do pré-

tratamento é o preparo da matéria-prima para que a conversão dos açúcares seja mais eficaz (CONDE-MEJÍA, 2012). Chiaramonti *et al* (2012) afirmam que o pré-tratamento representa cerca de 20% dos custos totais de produção, sendo considerada a fase com mais gasto de toda operação. No entanto, Galbe *et al* (2012) afirmaram que esta fase é de vital, se não a de maior, importância devido ao seu impacto nas demais fases do processo.

A escolha do método de pré-tratamento depende do resultado final desejado. Pode ser classificado como físico (trituração e moagem, micro-ondas e extrusão), químico (alcalino, ácido, solvente orgânico, ozonolise e líquido iônico), físico-químico (explosão a vapor, explosão de fibra com amônia, explosão com CO₂), e biológico. (MOOD, 2013; BEHERA, 2014).

Define-se pré-tratamento físico como o método em que não são utilizados químicos ou microorganismos durante o processo, além de possibilitar o aumento da área de superfície e o tamanho do poro de ligno(hemi)celulose, a diminuição da cristalinidade e o grau de polimerização da celulose presente na lignocelulose. Inclui-se neste método a fragmentação (trituração e moagem), a explosão a vapor (auto hidrólise), pré-tratamento com água quente (hidro-termólise), extrusão e irradiação (ultrassom e microondas). (ZHENG, 2014; BEHERA, 2014).

O pré-tratamento químico é método que utiliza ácidos, bases e líquidos iônicos para que haja alterações físicas e químicas na biomassa de lignocelulose. (ZHENG, 2014). Este tipo de pré-tratamento tem se tornado bastante promissor para aumentar a biodegradabilidade da celulose através da remoção de lignina e/ou hemicelulose. (BEHERA, 2014). Dentre os tipos de pré-tratamento químico, destaca-se a hidrólise ácida, um processo muito efetivo e bem conhecido para a obtenção da estrutura adequada para uma melhor fermentação alcoólica. É válido ressaltar que altas temperaturas são favoráveis para a hidrólise da celulose, visto que ácidos diluídos são comumente combinados com este tipo de temperatura, contrariamente ao que acontece com ácidos concentrados, os quais são combinados a baixas temperaturas. A hidrólise com ácidos diluídos é atualmente o método mais comum e mais adequado entre os pré-tratamentos químicos, mas deve haver um controle das condições, a fim de reduzir a produção de furfural e hidroximetilfurfural, proveniente da degradação de monossacarídeos pentose e hexose, respectivamente (CHIARAMONTI, 2012). Uma hidrólise alternativa utilizada em universidades nacionais e estrangeiras foi desenvolvida em 1984 no Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassas (LQBB),

o método utiliza ácido fosfórico diluído e termopressurizado, e foi desenvolvido para aplicação em bagaços de cana e sorgo (FONTANA, 1984).

Alguns autores afirmam que não há necessidade de separar o pré-tratamento físico-químico e o pré-tratamento químico, uma vez que aquele é considerado como melhoria deste, para reduzir o tempo e reação e melhora a eficiência (RABEMANOLONTSOA, 2016). O processo de pré-tratamento físico-químico tem como objetivo dissolver a hemicelulose e alterar a estrutura de lignina. Neste processo inclui-se métodos tais como: explosão a vapor (auto hidrólise), oxidação úmida, amônia aquosa, solvente orgânico e explosão com CO₂ (BEHERA, 2014).

Por fim, o pré-tratamento biológico consiste na aplicação de enzimas ou microorganismos ao material de ligno(hemi)celulose, sem a necessidade de utilização de requisitos químicos. Tem como vantagens a utilização de pouca energia, a não utilização de componentes tóxicos e um alto rendimento do produto desejado, sendo ambientalmente amigável. No entanto apresenta algumas desvantagens, como: um cuidadoso controle das condições de crescimento, a lentidão do processo, a necessidade de um grande espaço para realização deste método, fora o fato de que a maioria dos microorganismos solubiliza, além da lignina, a celulose e a hemicelulose, tornando este método menos atrativo comercialmente (MOOD, 2013; GALBE, 2012; BEHERA, 2014).

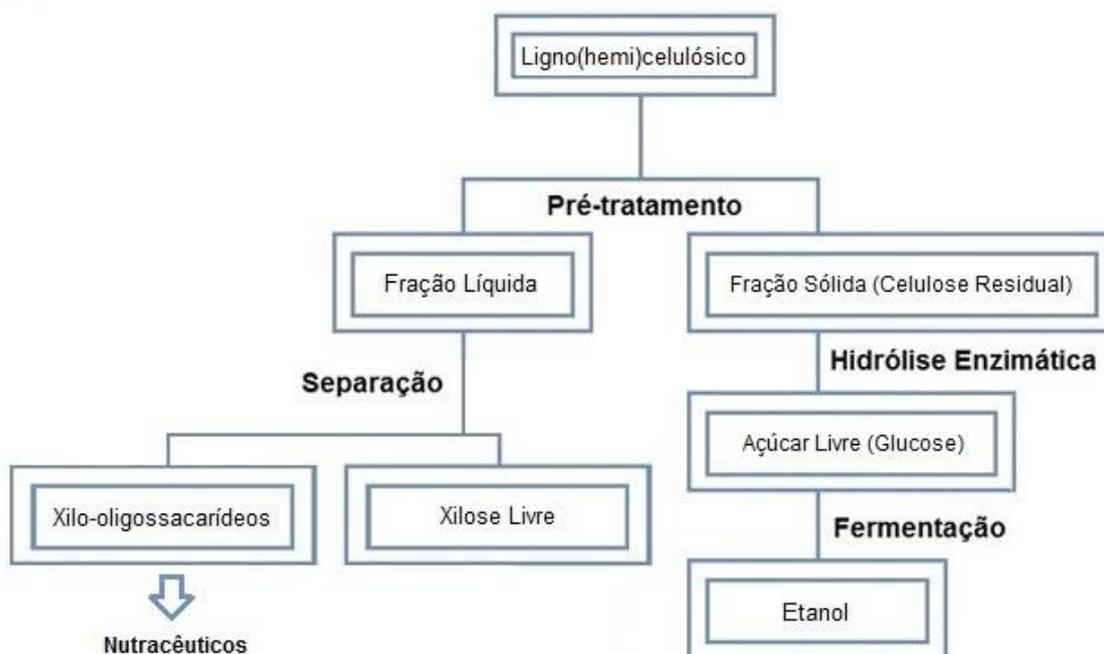
A utilização de ácidos diluídos, tais como ácido sulfúrico resulta em problemas associados com a contaminação de enxofre nos produtos de alimentação animal. Uma alternativa leva à possibilidade de utilização de ácidos mais fracos tal como o ácido fosfórico diluído (CASTRO, 2014). Apesar de seu custo mais elevado, existe várias vantagens: menos corrosivo e menos tóxico (LÓPEZ- LINARES, 2013), menor impacto ambiental; sendo uma ótima fonte de fósforo – nutriente para os microrganismos (DE VASCONCELOS, 2013).

O pré-tratamento com ácido O-fosfórico diluído e termopressurizado é considerado mais eficaz comparado aos processos hidrotermais (LENIHAN, 2010; OROZCO, 2011). A utilização de ácidos diluídos no pré-tratamento tem como objetivo a solubilização da hemicelulose e lignina, formando assim uma fração líquida com elevada concentração de açúcares (GÁMEZ, 2006). Esse ácido pertence as classes dos mais brandos, assim uma menor degradação da fração lábil da biomassa ligno(hemi)celulósica, obtendo-se o máximo aproveitamento tanto da celulose quanto

da hemicelulose, para elevar a eficiência da produção do bioetanol (TIBONI, 2015; ZHUANG, 2016).

A Figura 6 ilustra um diagrama de conversão da biomassa ligno(hemi)celulósica passando por vários estágios, levando-se em duas frentes: na produção de bioetanol e dos xilo-oligossacarídeos.

Figura 6 – Diagrama da conversão da matéria ligno(hemi)celulósica para etanol e oligossacarídeos.



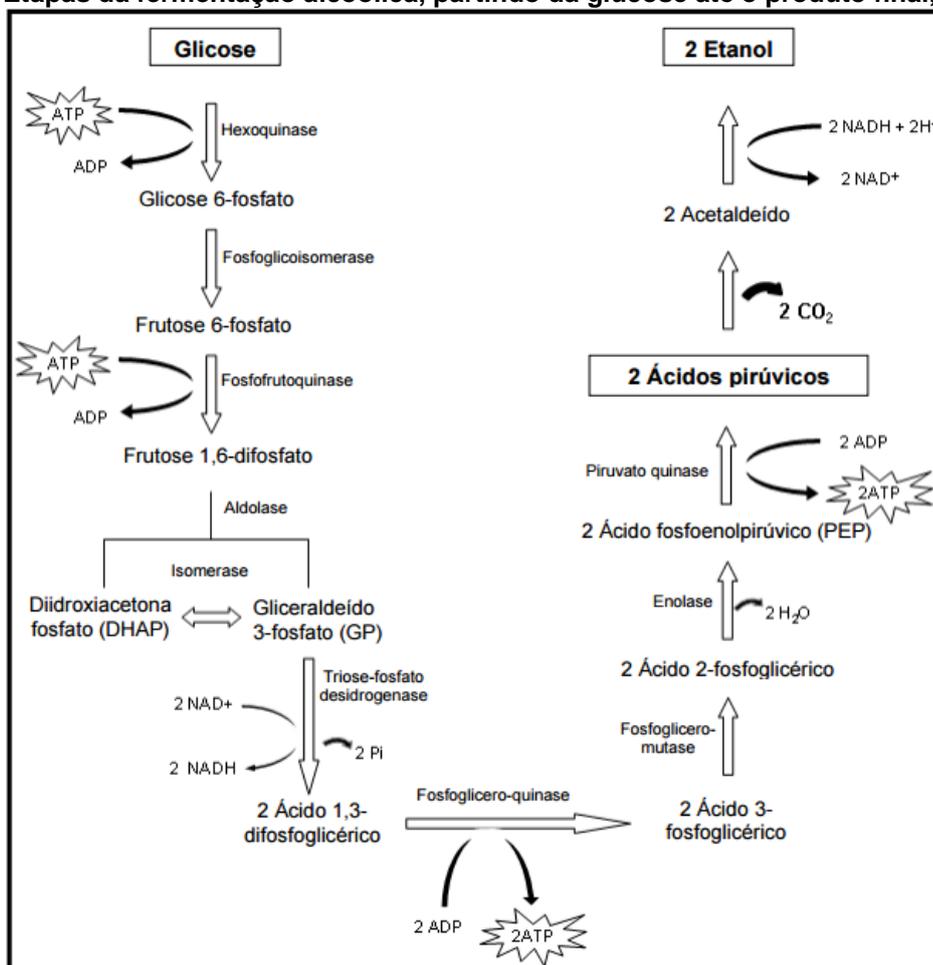
Fonte: Adp. ZHUANG (2016).

3.4.2 Fermentação Alcoólica

Com o desenvolvimento da tecnologia, avanços no setor de microbiologia e industrial, o álcool produzido em processos de fermentação, além de ser usado na produção de bebidas para o consumo, também — se produzido em larga escala — pode ser usado como combustível. A fermentação alcoólica é o processo mais utilizado para obtenção do etanol, por ser um dos mais econômicos e ter uma grande variedade de matérias-primas naturais que podem ser utilizadas, como: açucaradas e amiláceas (VÁSQUEZ, 2007; LÓPEZ-LINARES, 2013; KELBERT, 2015). Na figura a

seguir (Figura 7), mostra em detalhes o processo de fermentação alcoólica até seu produto final, o etanol.

Figura 7 – Etapas da fermentação alcoólica, partindo da glicose até o produto final, o etanol.



Fonte: SILVA (2010)

A fermentação alcoólica é a etapa posterior da sacarificação enzimática, onde no final desta etapa encontra-se açúcares livres (glucose). Na primeira fase da fermentação, chamada glicólise, a glucose é oxidada formando dois ácidos pirúvicos. Após essa etapa, os dois ácidos pirúvicos são transformados em acetaldeído e CO₂, as moléculas de acetaldeído são reduzidas pela ação das moléculas de NADH produzindo o etanol, Figura 5 (SILVA, 2010).

De forma simplificada, podemos deduzir a fermentação alcoólica de acordo com a reação a seguir:



As leveduras são os principais microrganismos que auxiliam na produção do etanol. Várias pesquisas são realizadas para melhorar a eficiência do processo, como: novas cepas de microrganismos, mudança do meio (pH, nutrientes, entre outros) de inoculação. A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* são as mais utilizadas, pois tem uma alta eficiência fermentativa (BORGES, 2008; AVCI, 2013).

Atualmente para otimizar o processo de fermentação alcoólica, existem leveduras, como a *Pichia* spp e a *Spathaspora* spp que conseguem fermentar pentoses e/ou seus oligossacarídeos para melhorar a eficiência da produção do bioetanol.

3.5 OLIGOSSACARÍDEOS

Oligossacarídeo (OS) é o nome dado a uma cadeia que possua entre 2 e 20 monossacarídeos. Aqueles compostos por apenas duas unidades são conhecidos como dissacarídeos, sendo mais comuns e abundantes da categoria, como exemplo temos a sacarose, formada por D-glucose e D-frutose (NELSON, 2006; KIM, 2009; ZHUANG, 2012; ZHANG, 2013; SAMANTA, 2015; WANG, 2015).

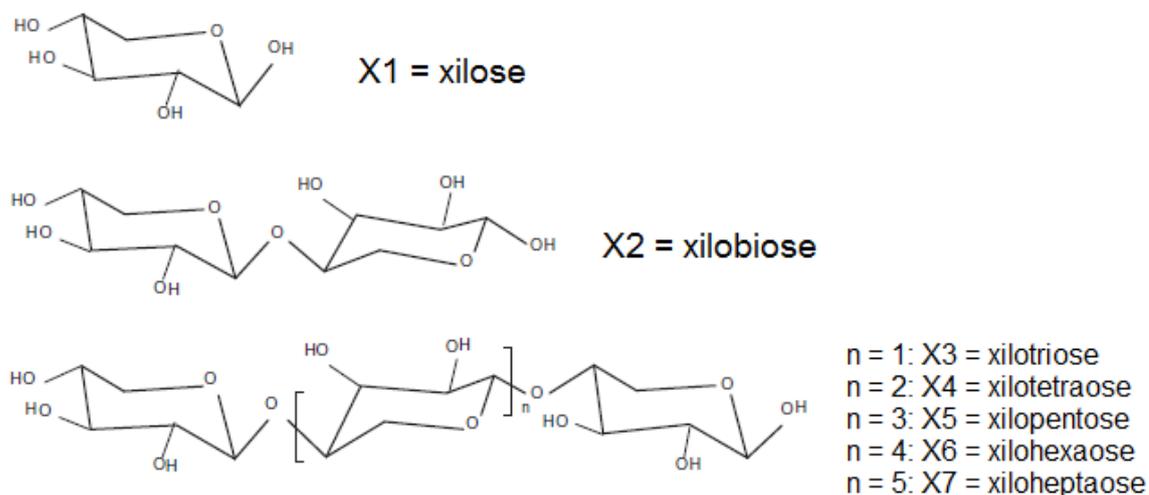
Alguns tipos de oligossacarídeos passam pelo trato gastrointestinal (TGI) humano sem sofrer degradação ou absorção (prebiótico). Neste caso, por meio da ação de bactérias que agem no cólon, alguns OS são fermentados, gerando ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que atuam na alteração da flora intestinal (por diminuição do pH), contribuem com processos de regulação celular, fornecem energia para tecidos do organismo, além de favorecerem o desenvolvimento de flora benéfica à saúde humana (bifidobactérias e lactobacilos - que são capazes de inibir o crescimento de bactérias prejudiciais) (BLAUT, 2002; MOURE, 2006; RASTALL, 2010; XIAO, 2012; CARVALHO, 2013; MONIZ, 2016).

Ainda tratando de benefícios à saúde, alguns oligossacarídeos, como galacto-oligossacarídeos, auxiliam a absorção de cálcio pelo intestino (aumentando a densidade óssea), colaboram para a redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos e auxiliam no tratamento da obesidade, devido a capacidade de reduzir a sensação de fome (MINEO, 2001; MOURE, 2006; SIRÓ, 2008; RASTALL, 2010).

Para trazer benefícios ao hospedeiro, os prebióticos (fibras alimentares solúveis) não devem ser digeridos pelo trato gastrointestinal, para posteriormente serem fermentados pela ação das bactérias intestinais no cólon. A inulina e os fruto-oligossacarídeos são os exemplos mais utilizados dos prebióticos. A dose de consumo diária recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para prevenção de câncer de colo retal, de infecções, entre outras doenças inflamatórias, é de 3 a 5 gramas. Excedendo essa quantidade, alerta-se que pode haver incômodos gastrointestinais, como inchaços e flatulência, devido à fermentação excessiva (BLAUT, 2002; ANJO, 2004; ANVISA, 2014; SAMANTA, 2015).

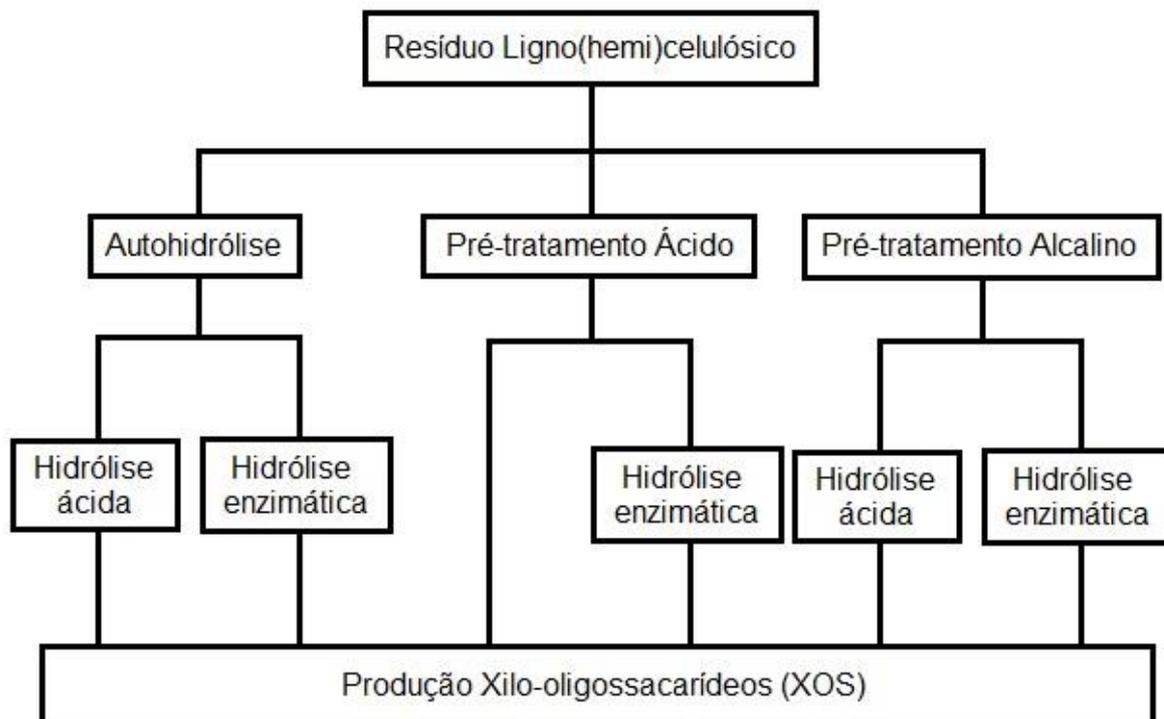
Os Fruto-oligossacáridos (FOS) são os oligossacarídeos mais comuns e comercializados relacionados a melhora nas funções intestinais, ação imunológica, antimicrobiana e outros benefícios à saúde, da mesma forma os Xilo-oligossacarídeos (XOS) apresentam essas atividades prebióticas, na Figura 8 é ilustrada a estrutura molecular da xilose e dos XOS. Já na Figura 9, mostra as várias formas de produzir os XOS.

Figura 8 – Estrutura de xiloses e xilo-oligossacarídeos.



Fonte: Adp. CARVALHO (2013).

Figura 9 – Algumas formas de hidrolises ou pré-tratamento para produção dos Xilo-oligossacarídeos a partir dos resíduos ligno(hemi)celulósicos.



Fonte: Adp. CARVALHO (2013).

4 METODOLOGIA

4.1 RESÍDUOS LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS – L(H)C

A casca de grãos de trigo (*Triticum aestivum*) e a casca de soja ou vagem esvaziada (*Glycine max L.*) foram fornecidas pela empresa CLASPAR/CODAPAR (Secretaria de Agricultura do Paraná) como cortesia de seu ex-diretor técnico Wagner Spirandelli.

Iniciou-se o tratamento das biomassas com a etapa de lavagem de uma alíquota das cascas de trigo e soja (500 mg de amostra em 5 mL de água), seguido da determinação dos açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico (item 4.4.2).

A próxima etapa foi a moagem da matéria-prima, processo para obtenção de partículas com menor granulometria (0,2 – 2 mm), a fim de aumentar a área superficial para contato com reagentes e o poder hidrolítico (CHIARAMONTI, 2012; GAO, 2013), sendo realizada no liquidificador Waring Blender Pro. Na sequência tamisou-se o moído da biomassa em diferentes granulometrias – sendo a de 20 – 100 Mesh utilizada nos experimentos posteriores para ambas as biomassas.

4.1.1 Caracterização das biomassas

Esta parte do desenvolvimento iniciou-se com a realização da extração das hemiceluloses, segundo metodologia adaptada (O'DWYER, 1939), em duplicata. Em um erlenmeyer de 500 mL contendo 10 g de casca de trigo ou soja triturada foi adicionado 200 mg de boridreto de sódio e 200 mL de solução de KOH 5 g%, sob agitação constante *overnight*. Então o material foi aquecido até fervura mantendo-se de 1 – 2 minutos. Após resfriamento, centrifugou-se a 12.000 rpm (28466 g-force) a biomassa por 20 minutos.

Após centrifugação, (i) recolheu-se o sobrenadante em uma proveta para medição do volume do qual separou-se uma alíquota de 1 mL em um eppendorf para

análises posteriores; e (ii) retornou-se a biomassa centrifugada (parte sólida) para nova extração com a adição de 100 mL de KOH 5 g%, deixando sob agitação constante em torno de 30 minutos.

Então, se repetiu o processo anterior de aquecimento, resfriamento e centrifugação, com conseguinte recolhimento de sobrenadante com separação de alíquota e retornando-se a biomassa centrifugada para o erlenmeyer contendo 50 mL de água destilada e nova repetição do processo de extração.

A partir desse momento, (i) o *pool* de sobrenadantes foi acidificado até pH 5 com ácido acético glacial, e então resfriado a 8°C por ao menos 12h e, concomitantemente, (ii) a biomassa centrifugada da última etapa de extração foi lavada até a neutralidade de pH, congelada e liofilizada. Todas as alíquotas foram mantidas em geladeira para posterior análise.

O sobrenadante acidificado e resfriado foi centrifugado por 20 minutos (a 12.000 rpm ou 28466 g-force). O precipitado, as hemiceluloses de alto peso molecular, foram recolhidas e congeladas. No novo sobrenadante adicionou-se 5 volumes de etanol 95% levando para refrigeração *overnight*.

Posteriormente, o extrativo alcoólico foi centrifugado durante 15 minutos (a 12.000 rpm ou 28466 g-force) e o precipitado, hemiceluloses de baixo peso molecular, foi congelado. As duas frações de hemicelulose foram unidas e liofilizadas. A determinação do peso seco foi utilizado para o cálculo de rendimento.

A determinação de lignina, foi realizada através de curva analítica, utilizando uma solução de lignina padrão. As alíquotas dos extrativos foram utilizados na proporção 50 µL de amostra + 50 µL de HCl + 900 µL de H₂O. As amostras foram lidas em Espectrofotômetro de UV-Vis (Biotek – Epoch 2 microplate reader) em 280 nm.

Por fim, o teor de cinzas foi obtido através da Mufla a 800°C, e o teor de umidade através da estufa a 120°C, ambos durante 4 horas.

4.2 AMOSTRA PADRÃO PARA OS OLIGOSSACARÍDEOS

Esta etapa consiste na realização de um ensaio de hidrólise ácida para obtenção de uma amostra de referência/padrão contendo oligossacarídeos.

4.2.1 Hidrólise Ácida com Ácido Trifluoracético (TFA)

Para realização da hidrólise ácida, 10 mg de diferentes amostras de hemicelulose (trigo e soja) foram hidrolisadas em eppendorfs com 1 mL de ácido trifluoracético (TFA) 4 mol/L em banho-maria a 80° C nos tempos 30, 60 e 180 minutos (ALBERSHEIM, 1967), contendo uma amostra com água destilada como branco, que permaneceu sobre aquecimento por 180 minutos.

A fim de remover o ácido das amostras, os eppendorfs destampados foram submetidos a pressão negativa, durante 30 minutos, objetivando que o ácido trifluoracético fosse volatizado. O restante do material foi congelado, liofilizado e posteriormente re-suspenso em 250 µL de água destilada.

O perfil foi analisado por Cromatografia de Camada Delgada - CCD (4.4.3) e os açúcares redutores determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico.

4.3 HIDRÓLISE COM ÁCIDO FOSFÓRICO TERMOPRESSURIZADO

A hidrólise por termopressurização com ácido O-fosfórico diluído (TIBONI, 2014) foi realizada utilizando como substrato os resíduos ligno(hemi)celulósicos casca de trigo e casca de soja. Pesou-se 3 gramas das biomassas com adição de 24 mL de água destilada em um erlenmeyer de 125 mL, ajustando seu pH desejado com ácido O-fosfórico diluído. Para garantir a completa vedação do reator de termopressurização (feito sob encomenda em 1986 pela metalúrgica Scybior), ilustrado na Figura 10, foi utilizado um silicone termoresistente (PolyStic). Por esse motivo as amostras permaneceram por até 12h dentro do reator desligado até completa polimerização do silicone.

Figura 10 – Reator de Termopressurização para realização do pré-tratamento fosfórico.



Fonte: Autoria própria.

O ensaio foi realizado através de Planejamento Fatorial 3^2 avaliando como variáveis a concentração de ácido fosfórico (pH) e a pressão (atm) (159 a 180°C = 5 a 9 atm) de acordo com a Tabela 3 abaixo.

Tabela 3 – Planejamento fatorial 3^2 para experimentação em termopressurização fosfórica.

Variáveis	(-)	0	(+)
pH	2,0	2,5	3,0
Pressão (atm)	5	7	9

Fonte: Autoria própria.

O delineamento experimental resultou em 9 experimentos, conforme descrito na Tabela 4.

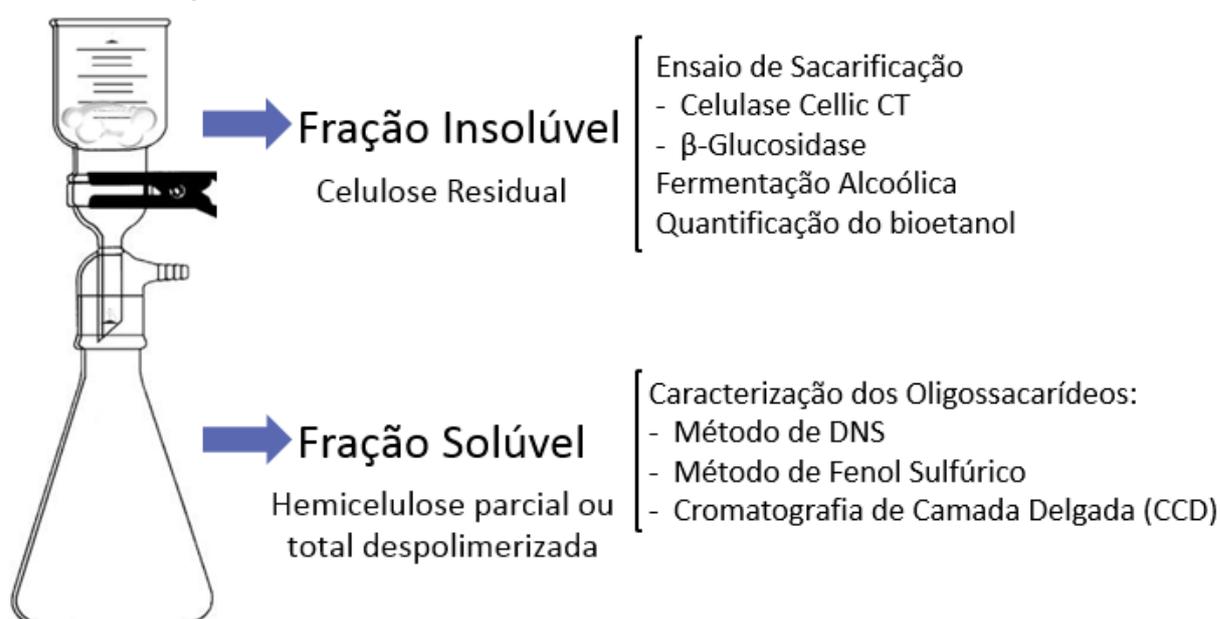
Tabela 4 – Delineamento das amostras avaliadas segundo Planejamento fatorial 3².

#		pH		Pressão (atm)
1	(-)	2,0	(-)	5
2	(+)	3,0	(-)	5
3	(-)	2,0	(+)	9
4	(+)	3,0	(+)	9
5	(-)	2,0	0	7
6	(+)	3,0	0	7
7	0	2,5	(-)	5
8	0	2,5	(+)	9
9	0	2,5	0	7
10	0	2,5	0	7
11	0	2,5	0	7

Fonte: Autoria própria.

Após atingir a pressão desejada o reator de termopressurização foi imediatamente desligado. Após resfriado e a pressão aliviada, a biomassa hidrolisada foi filtrada em funil de Buchner, com placa porosa de 4,5 – 5 µm, a um Kitasato acoplado com sistema à vácuo, separando assim a parte insolúvel, destinada para a sacarificação enzimática e fermentação alcoólica, da parte solúvel, para caracterização dos oligossacarídeos prebióticos, conforme ilustrado na Figura 11 abaixo (etapas estas descritas, respectivamente, nos itens 4.4 e 4.5).

Figura 11 – Esquema de filtração das biomassas pós pré-tratamento com ácido O-fosfórico diluído e termopressurizado.



Fonte: Autoria própria.

O volume recuperado foi completado com água destilada afim de obter uma proporção final de biomassa e filtrado de 1:10 (m/v). A Biomassa residual foi lavada com mais 20 mL de água para garantir a completa remoção de todo o açúcar livre residual. O remanescente sólido no filtro, parte insolúvel, foi congelado e liofilizado para posterior análises.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS

A análise da fração solúvel (oligossacarídeos), foi realizada de acordo com as seguintes metodologias para cumprimento dos objetivos específicos: quantificação e qualificação por métodos colorimétricos; método do ácido dinitrosalicílico (DNS) de acordo com Miller (1959) e método do fenol-sulfúrico de acordo com Dubois (1956); e utilizando também cromatografia de camada delgada para identificação dos açúcares presentes.

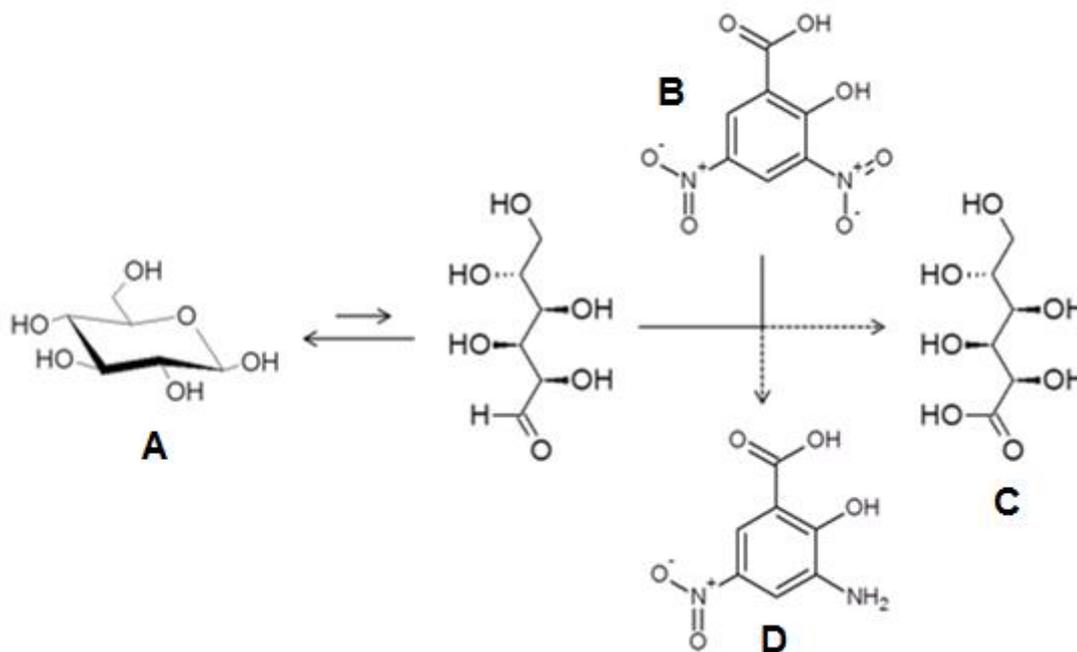
Para análise da concentração de açúcares nas amostras através dos métodos colorimétrico, realizou-se as devidas curvas analíticas com concentrações conhecidas de xilose para cálculos posteriores

4.4.1 Determinação dos Açúcares Redutores

A quantificação dos açúcares redutores se deu através do método do ácido dinitrosalicílico de acordo com metodologia adaptada de Miller (1959). As amostras foram devidamente diluídas e analisadas em triplicada, em tubos de hemólise, na proporção de 150 µL de amostra e 100 µL do reagente DNS. Após 2 minutos a 100°C, a fim de encerrar a reação, foi adicionada 750 µL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV – Vis (Biotek – Epoch 2 microplate reader) em 540 nm.

Na Figura 12, ilustra a reação de redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico que acontece no decorrer do método, ou seja, a redução parcial do dinitrosalicílico a mononitro-monoamino-salicílico por conta do poder redutor dos açúcares livres.

Figura 12 – Equação da reação de redução do Ácido 3,5-dinitrosalicílico.



Nota: A. Açúcar Redutor – glucose; B. Ácido 3,5-dinitrosalicílico - Cor Amarelada; C. Ácido Carboxílico do Açúcar; D. 3-amino-5-nitrosalicílico - Cor Laranja-avermelhada.
Fonte: TIBONI (2015).

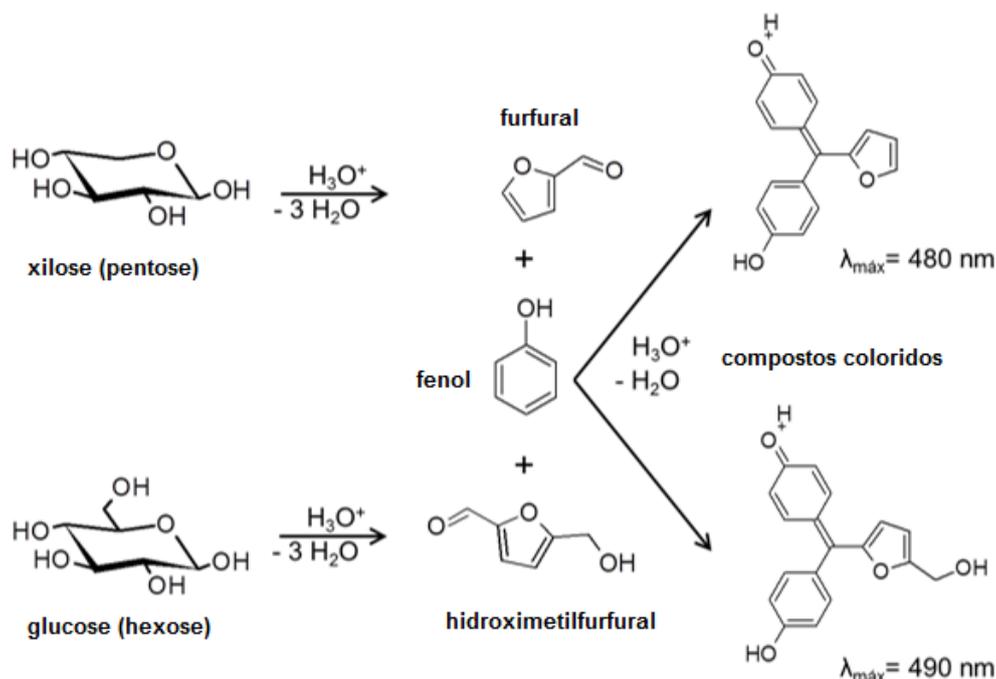
4.4.2 Determinação dos Açúcares Totais

Para a determinação dos açúcares totais utilizou-se o método do fenol-sulfúrico adaptado de Dubois (1956). As amostras foram feitas em triplicata, em tubos de ensaio. As amostras convenientemente diluídas (630 μL) foram adicionadas de 400 μL de solução de fenol 5%. Na sequência, adicionou-se - de forma rápida e direta, 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após repouso de 15 minutos, realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV – Vis (Biotek – Epoch 2 microplate reader) em 480 nm para pentoses.

Na Figura 13, ilustra a reação para determinação de açúcares totais utilizando o método Fenol-Sulfúrico qual seja a progressiva e tríplice desidratação de unidade de xilose ou glucose, respectivamente gerando furfural e hidroximetilfurfural os quais, por conta do meio fortemente ácidos, covalentemente são acoplados ao orcinol co-

reagente gerando cor típica mensurável a 480 nm para as pentoses e a 490 nm para as hexoses.

Figura 13 – Equação da reação de determinação de Açúcares Totais.



Fonte: TIBONI (2015).

4.4.3 Cromatografia em Camada Delgada

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatoplasmas Merck de sílica – gel 60. Como fase móvel utilizou-se uma mistura de acetonitrila, isopropanol e água destilada na proporção 15:3:5 (v/v) colocada previamente na cuba para saturação. Como revelador utilizou-se orcinol sulfúrico (250 mg de orcinol/45 mL de metanol + 2,5 mL de H_2SO_4) seguido de aquecimento por alguns minutos.

As soluções de padrão utilizadas foram: xilose, glucose, arabinose, galactose, ramnose, manose, celobiose; e dos produtos de degradação: hidroximetilfurfural (HMF) e furfural e de oligossacarídeo (OS): Xilo-oligossacarídeos (XOS) e Celo-oligossacarídeos (COS).

4.5 RESÍDUOS LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS – L(H)C INSOLÚVEIS

As análises em relação a fração insolúvel (celulose residual), foram realizadas de acordo com as metodologias para cumprimento dos objetivos específicos: sacarificação enzimática dos substratos pré-tratados (4.5.1), fermentação alcoólica do substrato com melhor poder de sacarificação (4.5.2), e quantificação do etanol produzido utilizando CLAE (4.5.3).

4.5.1 Hidrólise Enzimática

Esta etapa consiste na realização da sacarificação enzimática das biomassas pós pré-tratamento, utilizando determinadas enzimas descritas abaixo:

4.5.1.1 Enzimas

Para o processo de sacarificação enzimática foram utilizadas as enzimas: celulasas Cellic CTec 2 – mistura de enzimas que contém endoglucanases e celobiohidrolases I e II e a β – glucosidase. Esta etapa foi viabilizada pela empresa Novozymes Latin America Ltda, de Araucária/PR, que forneceu as enzimas.

4.5.1.2 Sacarificação Enzimática

O processo de sacarificação enzimática foi realizado com 200 mg da fração insolúvel liofilizada do pré-tratado com ácido fosfórico diluído (celulose residual), em frascos de penicilina, com volume final de 4 mL (1:20 m/v) contendo: 16 μ L/mL enzimas celulasas e β – glucosidase (1:1; v/v) e solução tampão de citrato de sódio

50 mmol/L em pH 5, e assim destinado para um agitador-incubador a velocidade de 160 rpm à 50°C.

Foram coletadas amostras nos tempos de 48 e 96 horas, às quais foi realizada a determinação dos açúcares redutores através do método DNS (4.4.1). Para determinação do substrato com maior poder de sacarificação calculou-se a porcentagem de hidrólise nos dois tempos, escolhendo-se assim as melhores alíquotas com seu determinado pH e pressão para a continuação dos experimentos.

4.5.2 Fermentação Alcoólica

Para que a etapa de fermentação alcoólica ocorresse primeiramente foi necessária a preparação do meio de cultivo para o crescimento das cepas utilizadas e assim para a fermentação em si.

4.5.2.1 Meio de Cultivo e Microrganismo

Para o preparo do meio de cultivo, duas soluções foram preparadas contendo metade do volume total de água. O pH foi ajustado para 5,5 com auxílio de soluções de NaOH e H₃PO₄. Após esterização por autoclave durante 20 minutos a 1 atm, as soluções foram combinados, finalizando com as proporções indicadas nas Tabelas 5.

Tabela 5 – Soluções do Meio de Cultivo.

	Reagente	Massa (mg%)
A	Fosfato Diácido de Amônio	200
	Nitrato de Sódio	40
	Sulfato de Potássio	40
	Casaminoácidos	400
	Extrato de Levedura	200
	Extrato de Malte	200
B	Glucose	4
	Ágar	4

Nota: A. Solução de sais; B. Solução de glucose.

Fonte: Autoria própria.

As placas foram preparadas em câmara fluxo laminar com luz UV e a inoculação das cepas dos microrganismos utilizados sobre fluxo de ar.

As cepas utilizadas neste processo foram: (I) *Sacharomyces cerevisiae* e (II) *Pichia stipitis*; Primeiramente as cepas foram reativadas nas placas de petri, em uma estufa com fotoperíodo tipo BOD por 24h, 35°C.

4.5.2.2 Fermentação alcoólica da celulose sacarificada

Primeiramente a placa com as células reativadas foi “lavada” com o meio preparado. Em tubos de ensaio, foram adicionados: 1 mL do *pool* celular reativado (solução da placa de petri), 5 mL do hidrolisado – amostras com maior poder de sacarificação, a saber: (I) pressão 5 atm e pH 2, (II) pressão 7 atm e pH 2,5 II, e (III) pressão 9 atm e pH 3 tanto para casca de trigo quanto para de soja, todas realizadas em triplicata; e 5 mL de solução de sais para o processo de fermentação alcoólica. O cultivo se deu durante 4 dias, a 35°C.

Foram retiradas alíquotas de 1 mL nos tempos 0h, 24h, 48h e 72h. Estas foram centrifugadas a 14.000 rpm (16654 g), durante 5 minutos (Eppendorf; Mini Spin Plus), sendo analisados posteriormente tanto o precipitado como os sobrenadantes.

Ao precipitado, foi adicionado 1 mL de solução salina NaCl 0,9 M. Após resuspensão das células foi realizada a análise do crescimento microbiano através da técnica de turbidimetria em 660 nm.

4.5.2.3 Crescimento Microbiano

Pelo método indireto de turbidimetria (adp. CARVALHO, 1994), realizou-se a análise das biomassas de células totais com o objetivo de estimar o crescimento celular durante o período de fermentação alcoólica. As amostras resuspensas na etapa anterior foram analisadas, em triplicata, em espectrofotômetro UV – Vis (Biotek – Epoch 2 microplate reader) em 660 nm.

4.5.3 Quantificação do Bioetanol

Para determinação da quantidade produzida de bioetanol a fração sobrenadante das amostras retiradas dos cultivos foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) – Shimadzu LC-10 station, utilizando uma coluna Phenomenex – Rezex para ácidos orgânicos (ROA) (300x7,8 mm x 8 µm), mantida a uma temperatura de 50°C, de acordo com Fontana (2011). Como fase móvel utilizou-se solução de ácido sulfúrico 8 mmol/L, com fluxo de 0,5 mL/min e detector RID. As amostras, com *loop* de 20 µL, foram convenientemente diluídas e filtradas com membrana de 0,45 µm antes de serem injetadas. Anteriormente à análise das alíquotas, uma curva analítica foi realizada com concentrações crescentes de etanol conhecidas (5 – 20 µL/mL) para posterior cálculo de concentração.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta etapa do projeto inicia-se a apresentação dos resultados obtidos com o desenvolvimento da metodologia anteriormente descrita, se desejando observar e analisar os resultados e alcançar os objetivos inicialmente propostos.

5.1 RESÍDUOS LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS – L(H)C

Os resultados da análise de açúcares totais, pelo método fenol-sulfúrico, da água de lavagem das amostras foram considerados baixos e satisfatórios para prosseguir com as etapas sem a necessidade de lavagem. Com os resultados, pudemos concluir que a lavagem não alterava significativamente a porcentagem de açúcares na biomassa, ou seja, a porcentagem de mg de açúcar por mL de água em contato com a biomassa foi baixa (0,88% mg de açúcar por mL na casca de trigo e 2,38% mg de açúcar por mL na casca de soja), sendo o volume de 500 mg de biomassa utilizadas em um volume total de água de 5 mL para extrair os açúcares.

Como descrito na metodologia (item 4.1.1), os materiais foram processados em liquidificador e tamisados, obtendo diferentes granulometrias mostradas nas Figuras 14. A amostra escolhida de maneira arbitrária foi a de granulometria entre 20 – 100 mesh, equivalente a partículas de tamanho entre 150 – 850 μm .

Figura 14 – Foto da casca de trigo e soja trituradas e tamisadas em diferentes granulometrias.



Nota: (A) Casca de Trigo; (B) Casca de Soja; (1) ≤ 100 Mesh; (2) 20 – 100 Mesh (Amostra utilizada para os experimentos - circulada em vermelho); (3) 12 – 20 Mesh; (4) ≥ 12 Mesh.

Fonte: Autoria própria.

5.1.1 Caracterização da Biomassas

A caracterização das biomassas foi realizada pela determinação do conteúdo de celulose, hemicelulose, lignina e teor de cinzas das amostras em 10 g. A quantificação de hemicelulose se deu por gravimetria do material liofilizado após dupla extração com KOH 5g%. A biomassa centrifugada da ultima etapa de extração também liofilizada e foi considerada como o conteúdo celulósido, conforme Tabela 6.

Tabela 6 – Valores de porcentagem de Celulose e Hemicelulose nas biomassas estudadas.

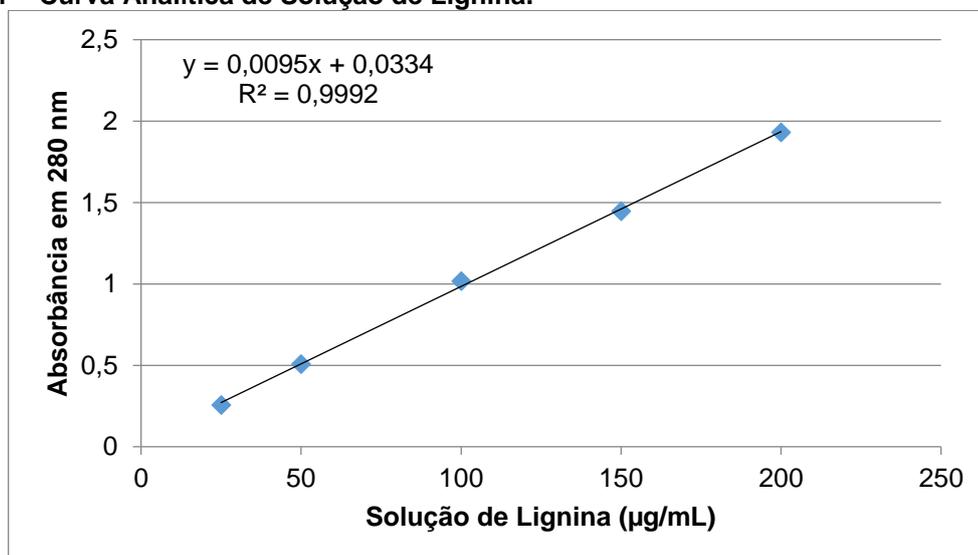
	% Média de Celulose na biomassa	Desvio Padrão	% Média de Hemicelulose na biomassa	Desvio Padrão
Casca de Soja	48,05	2,51	25,25	2,89
Casca de Trigo	47,07	0,10	20,40	4,28

Fonte: Autoria própria.

De acordo com a literatura, a porcentagem de celulose e hemicelulose das cascas de soja e trigo estão próximos ao que encontramos no experimento.

A partir das alíquotas dos extrativos alcalinos foi realizada a determinação do teor de lignina total. Para a realização dos cálculos foi necessária a realização de uma curva analítica, apresentada no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Curva Analítica de Solução de Lignina.



Fonte: Autoria própria.

Na sequência, com auxílio da equação da reta, foram calculadas as concentrações de lignina na casca de soja, vide Tabela 7.

Tabela 7 – Valores de porcentagem de lignina nas cascas de soja e trigo.

	% Média de Lignina na biomassa	Desvio Padrão
Casca de Soja	6,37	0,30
Casca de Trigo	20,32	3,09

Fonte: Autoria própria.

Por fim, o resumo de todas as informações acima apresentadas pode ser observado na tabela abaixo (Tabela 8):

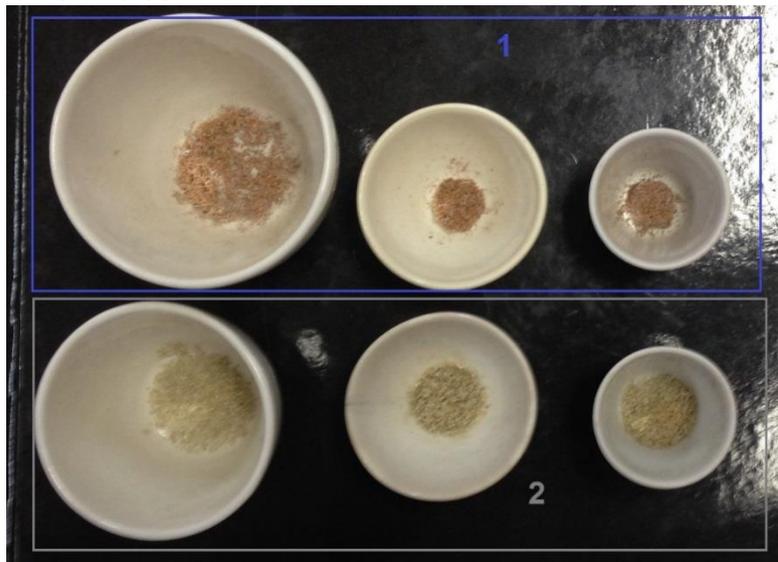
Tabela 8 – Valores da caracterização química das biomassas estudadas.

Biomassa	% Cel.	% Hemicel.	% Lign.	% Cinzas	% Teor Umidade	% Total	Desvio Padrão
Casca de Soja	48,05	25,25	6,37	2,73	1,21	83,61	0,68
Casca de Trigo	47,07	20,40	20,32	6,72	1,03	95,54	2,56

Fonte: Autoria própria.

A porcentagem de cinzas observada na casca de trigo, aproximadamente 2,5 vezes maior que o obtido com a casca de soja, é resultado da presença de sílica no material – que durante a queima é liberada na forma de silicato (SiO_2) (CUI², 2015). As cinzas podem ser vistas na Figura 15.

Figura 15 – Foto das cinzas das cascas de trigo e soja, no qual foram obtidas com auxílio da Mufla a 800°C durante 4 horas.

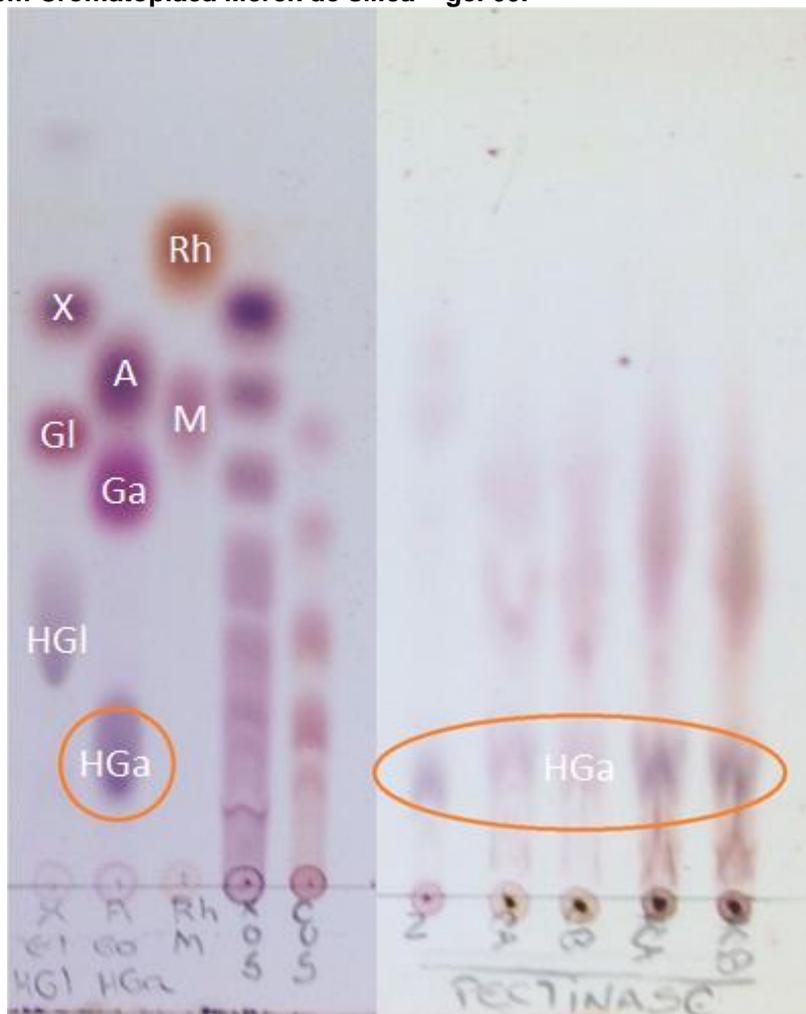


**Nota: 1. Cinzas de casca de Trigo; 2. Cinzas de casca de Soja.
Fonte: Autoria própria.**

De acordo com as composições químicas das biomassas tabeladas (Tabela 1 e 2) na contextualização teórica (3.2 e 3.3), nota-se que, além da composição principal (celulose, hemicelulose e lignina) e proteína. A casca de trigo possui traços de amido, já na casca de soja de pectina. A cromatografia de camada delgada ajudou a observar e afirmar a presença da pectina, pois nas amostras contém ácido da degradação deste carboidrato (ácido galacturônico) – ver figura 16).

Além disso, nota-se que o método de caracterização das cascas de soja e trigo foram bem eficazes comparado com os resultados das Tabela 1 e 2, por sua similaridade em relação a sua composição.

Figura 16 – Resultado do teste cromatográfico para identificação de carboidratos na Casca de Soja realizada em Cromatoplaça Merck de sílica – gel 60.

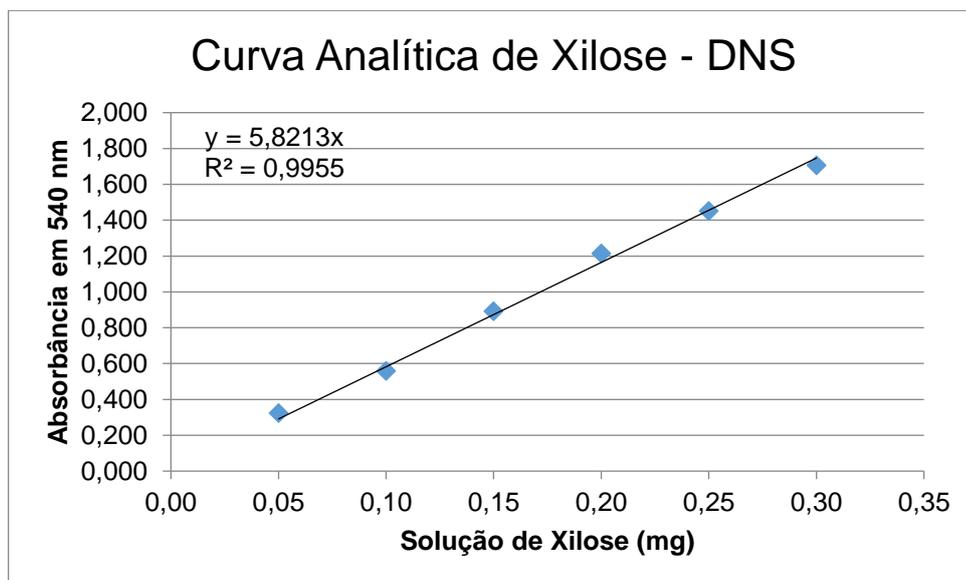


Nota: (X) xilose; (Gl) glucose; (HGl) ácido glucurônico; (A) arabinose; (Ga) galactose; (HGa) ácido galacturônico; (Rh) ramnose; (M) manose; (XOS) xilo-oligossacarídeos; (COS) Celoligossacarídeos. Identificação do ácido galacturônico circulada em vermelho nas amostras.
Fonte: Autoria própria.

5.2 AMOSTRA PADRÃO PARA OLIGOSSACARÍDEOS

Para analisar as amostras referência/padrão de oligossacarídeos foi utilizado o método de determinação de açúcares redutores DNS (item 4.4.1), logo construiu-se uma curva analítica com concentrações conhecidas de xilose, conforme Gráfico 2.

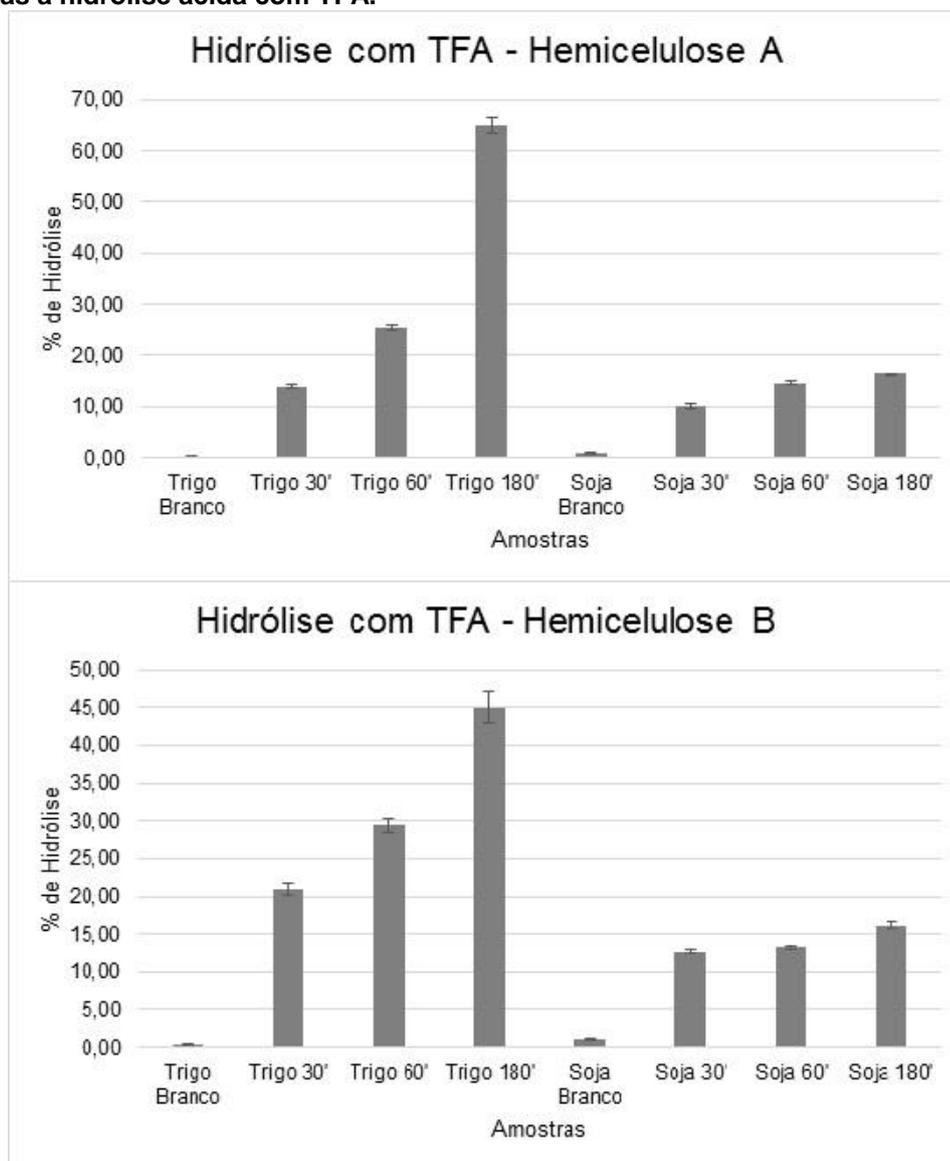
Gráfico 2 – Curva Analítica de solução de xilose (mg) com sua determinada equação da reta e R^2 .



Fonte: Autoria própria.

Através da curva analítica foi calculado as concentrações de açúcares redutores (mg/amostra) na Hemicelulose A e B em cada tempo que permaneceu no banho-maria (80°C), logo após foi calculada a porcentagem de hidrólise de cada amostra, conforme ilustrado no Gráfico 3, respectivamente.

Gráfico 3 – Porcentagem de Hidrólise nas amostras de Hemicelulose A e B que foram submetidas a hidrólise ácida com TFA.



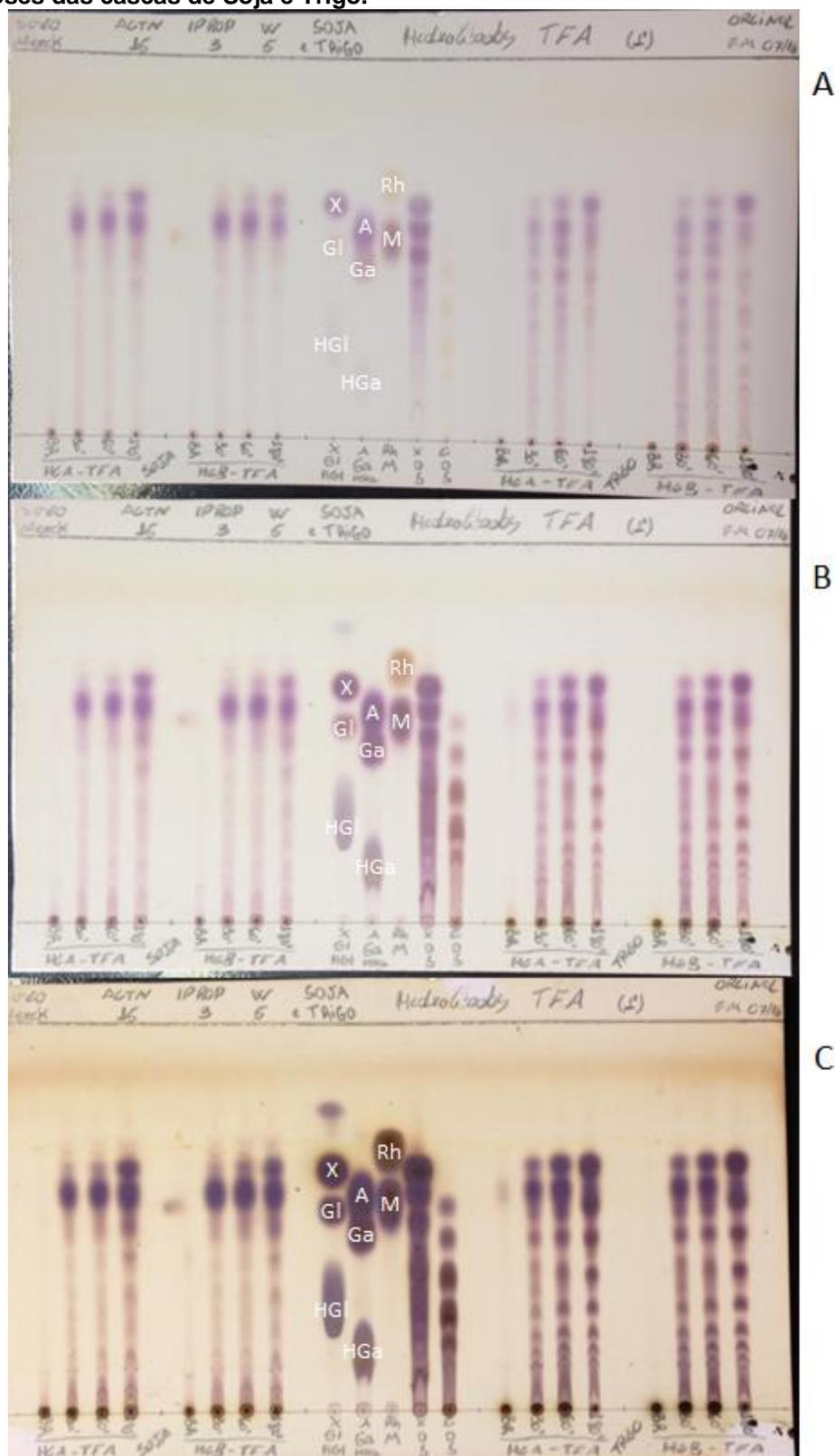
Fonte: Autoria própria.

De acordo com os gráficos, nota-se que a porcentagem de hidrólise da amostra de hemicelulose A e B da casca de trigo foram bem superiores à da casca de soja – chegando em média de 55% e 16%, respectivamente, mensurado por açúcares redutores. Ambas as biomassas quanto mais tempo em fervura, maior a resposta do açúcar redutor, logo mais açúcares livres nas amostras. Esse método quantifica as amostras de hemicelulose com maior porcentagem de açúcar livre, no nosso caso foi o Trigo a 180 minutos.

Para podermos ter um perfil preliminar dos oligossacarídeos nas nossas amostras, foi realizado por cromatografia de camada delgada (CCD), ilustrada na Figura 17.

Conforme a CCD, em todas as condições experimentadas de 30, 60 e 180 minutos, observou-se produção de oligossacarídeos (OS), tanto na hemicelulose A quanto a B, podendo notar também essa produção com maior intensidade na biomassa de casca de trigo.

Figura 17 - Cromatografia de Camada Delgada da cinética de tempo da Hidrólise com TFA das hemiceluloses das cascas de Soja e Trigo.



Nota: Fase Móvel – acetonitrila, isopropanol e água (15:3:5); Revelador – orcinol sulfúrico; Padrões: (X) xilose, (GI) glucose, (HGI) ácido glucurônico, (A) arabinose, (Ga) galactose, (HGa) ácido galacturônico, (Rh) ramnose, (M) manose, (XOS) xilo-oligossacarídeos e (COS) celo-oligossacarídeos; A → C (tempo de aquecimento da placa, sendo A < B < C).
Fonte: Autoria própria.

5.3 HIDRÓLISE COM ÁCIDO FOSFÓRICO

A hidrólise com ácido O-fosfórico (oPA) diluído e termopressurizado permitiu o rompimento do entrelaçamento dos principais componentes das biomassas (celulose, hemicelulose e lignina). Por pertencer a classe dos mais brandos, esse ácido permite que tanto a celulose do resíduo ligno(hemi)celulósico quanto as hemiceluloses não sejam danificadas no processo.

Como mencionada no item 4.3, a partir desta hidrólise com ácido fosfórico pode-se levar a pesquisa em duas frentes de experimentos. A primeira utilizando a hemicelulose (parte solúvel) e a segunda utilizando a celulose residual (parte insolúvel).

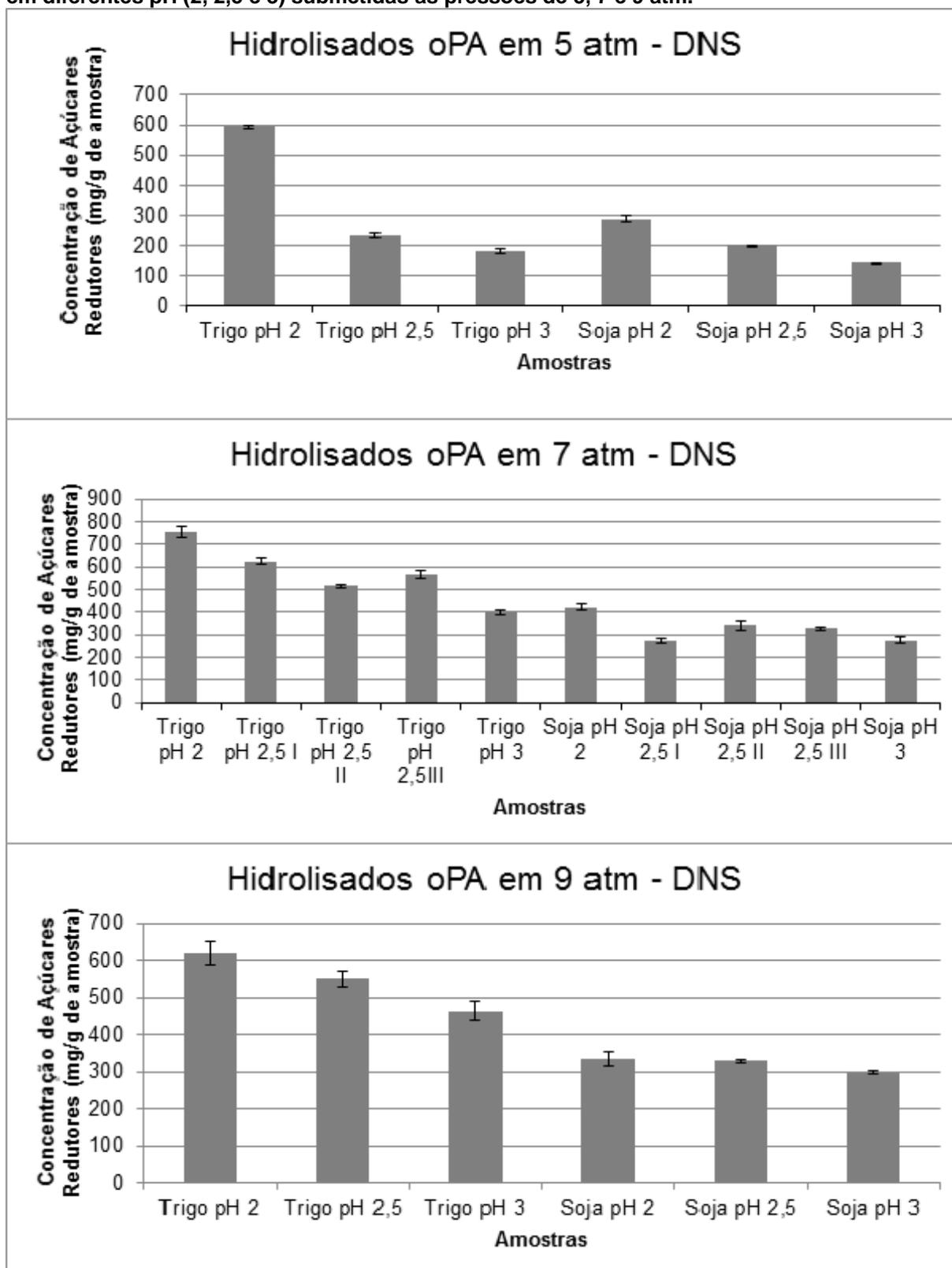
5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS

A caracterização dos oligossacarídeos, da parte solúvel, após serem analisados por métodos colorimétricos para quantificação (açúcares redutores - método do ácido dinitrosalicílico; açúcares totais - método fenol-sulfúrico), foram qualificados por cromatografia em camada delgada (CCD) permitiu a obtenção dos seguintes resultados:

5.4.1 Determinação de Açúcares Redutores

Essa etapa de pesquisa permitiu obter como resultado as concentrações de açúcares redutores nas amostras submetidas a determinadas pressões (5, 7 e 9 atm) e diferentes pHs, com base na curva analítica construída no método de DNS no item 5.2.1 (Gráfico 2) realizou os cálculos. Conforme é ilustrado nos Gráficos 4.

Gráfico 4 – Concentrações de açúcares redutores (mg/g de amostra) nas amostras analisadas em diferentes pH (2, 2,5 e 3) submetidas as pressões de 5, 7 e 9 atm.



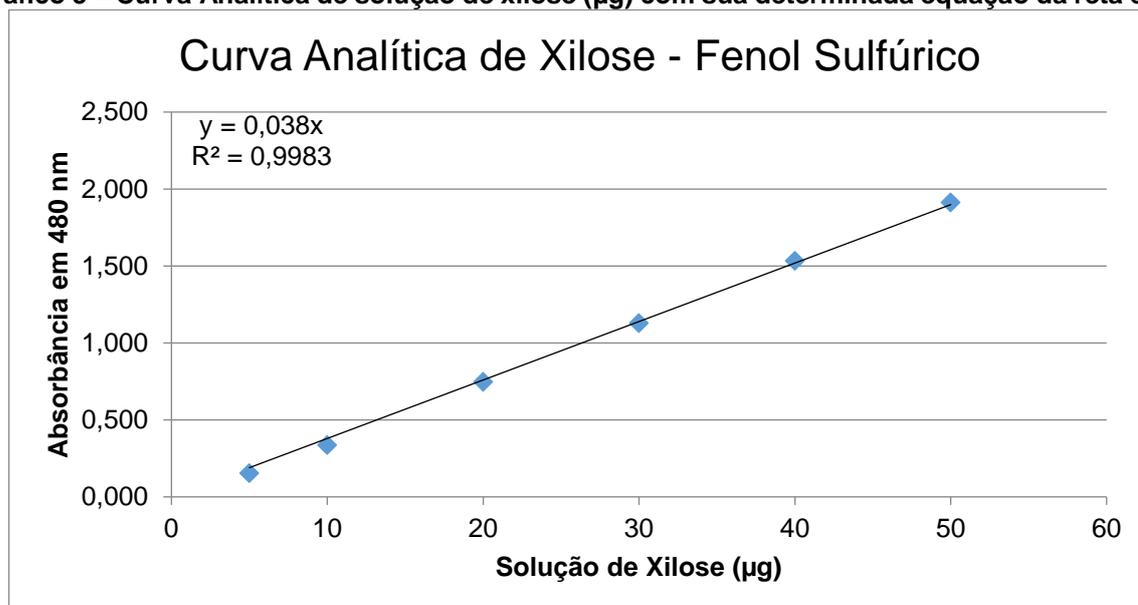
Fonte: Autoria própria.

De acordo com os gráficos apresentados, nota-se que a determinação de açúcares redutores, através do método DNS, dos hidrolisados de ácido O-fosfórico diluído possibilitou a comparação entre as biomassas, confirmando que a casca de trigo tem maior concentração de açúcares redutores comparada a casca de soja. As melhores condições tanto para casca de trigo quanto para de soja foram de 7 atm em pH 2 (750 mg/g de amostra para o trigo e 420 mg/g de amostra para a soja). Vendo que com o aumento do pH, as concentrações de açúcar redutor foram diminuindo (pH 2 > pH 2,5 > pH 3), mostrando que em pH mais ácidos as biomassas pós hidrolisadas contêm uma maior resposta de açúcares redutores, indicando uma maior quantidade de extremidades redutoras na amostra.

5.4.2 Determinação de Açúcares Totais

De acordo com os resultados obtidos nessa fase da pesquisa, a partir do método de Fenol-Sulfúrico, calculou-se as concentrações total de açúcar nas amostras submetidas a determinadas pressões (5, 7 e 9 atm) e diferentes pHs, com base na curva analítica (Gráfico 5).

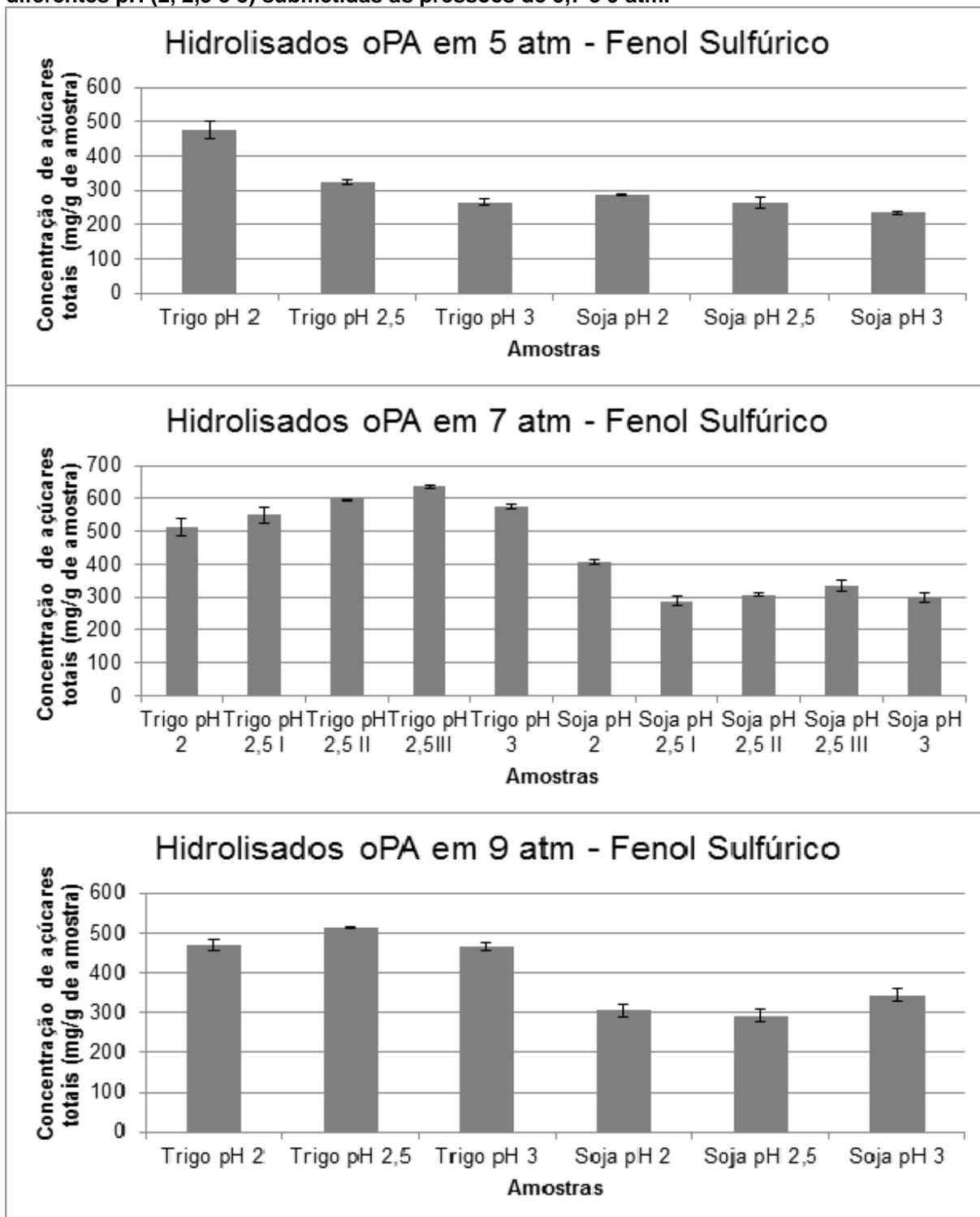
Gráfico 5 – Curva Analítica de solução de xilose (μg) com sua determinada equação da reta e R^2 .



Fonte: Autoria própria.

A partir dos resultados de concentrações, plotou-se os gráficos (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Concentrações de açúcares totais (mg/g de amostra) nas amostras analisadas em diferentes pH (2, 2,5 e 3) submetidas as pressões de 5,7 e 9 atm.



Fonte: Autoria própria.

Com os resultados através do método, nota-se a quantificação de açúcares totais nas amostras, é considerável um método mais confiável e fiel para a determinação de açúcares totais de uma amostra, seja eles monossacarídeos, dissacarídeo ou até pentassacarídeo, inclusive uma mistura de açúcares. O método desidrata todos os tipos de açúcar, dando como produto de degradação o furfural para pentoses e hidroximetil furfural para hexoses. O aldeído formado no final da reação é capaz de condensar com duas moléculas de fenol assim resultando o composto de cor amarelo-alaranjado, exemplificado na metodologia (item 4.4.2).

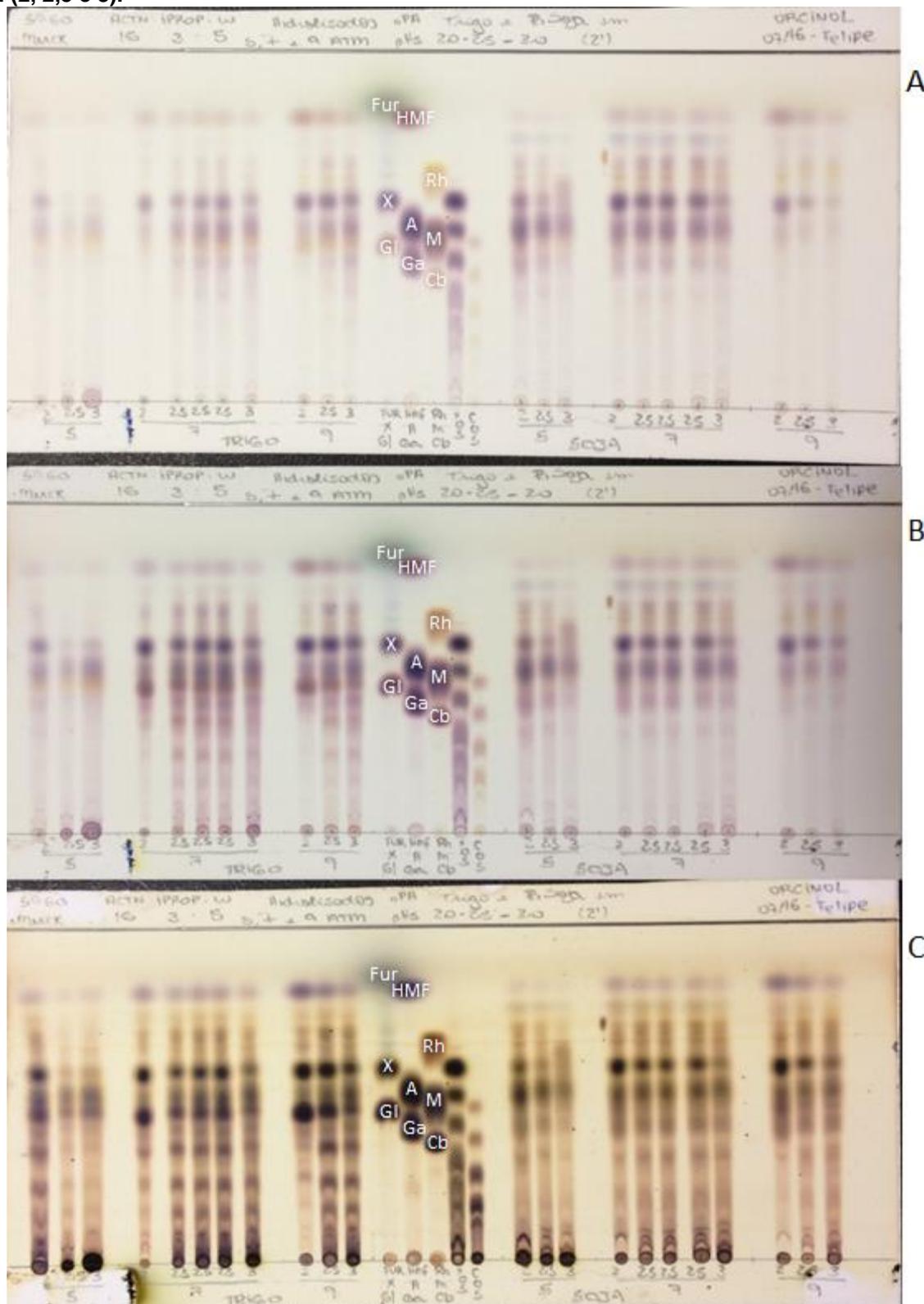
De acordo com os gráficos, o trigo novamente possui uma concentração de açúcares totais maiores que a soja, a melhor condição experimentada foi em 7 atm – em média de 640 mg/g de amostra para o trigo e 410 mg/g de amostra para a soja.

5.4.3 Cromatografia de Camada Delgada

A cromatoplaça resultante desta etapa de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) está ilustrada na Figura 18, que representa a comparação entre as amostras das cascas de soja e trigo pós pré-tratamento O-fosfórico em seus determinados pH e pressão, tendo ao centro da placa de sílica as amostras padrão, como: xilose (X), arabinose (A), manose (M), galactose (Ga), glucose (Gl), celobiose (Cb), ramnose (Rh); e dos produtos de degradação: hidroximetilfurfural (HMF) e fufural (Fur); e de oligossacarídeos (OS): de xilo-oligossacarídeos (XOS) e celo-oligossacarídeos (COS), para auxílio de qualificação dos oligossacarídeos.

De acordo com a CCD, temos um perfil de oligossacarídeos (OS) em todas as condições experimentadas, com um maior teor nas condições de 7 atm no hidrolisado oPA de casca de trigo e de soja.

Figura 18 – Cromatografia de Camada Delgada realizada com os Hidrolisados (parte solúvel) do pré-tratamento O-fosfórico diluído e termopressurizado em determinadas pressões (5, 7 e 9) e pH (2, 2,5 e 3).



Nota: Fase Móvel – acetonitrila, isopropanol e água (15:3:5); Revelador – orcinol sulfúrico; Padrões: (FUR) furfural, (X) xilose, (Gl) glucose, (HMF) hidroximetilfurfural, (A) arabinose, (Ga) galactose, (Rh) ramnose, (M) manose, (Cb) celobiose, (XOS) xilo-oligossacarídeos e (COS) celo-oligossacarídeos; A → C (tempo de aquecimento da placa, sendo A < B < C).

Fonte: Autoria própria.

O método de DNS e de Fenol-sulfúrico são teste complementares, o primeiro resulta na quantificação de extremidades redutoras na amostra, podendo estar ligados em um monossacarídeo ou até em um pentassacarídeo, mas é bom ressaltar, em relação aos valores de DNS estarem dando maiores que de Fenol sulfúrico em alguns casos, é pelo fato de desse método possuir limitações, porque ele faz uma estimativa dos açúcares redutores na amostra e também se qualquer outra substância no meio tiver o poder de redução do reagente de DNS, ocasiona um resultado falso positivo, logo somando aos resultados de açúcares redutores.

Já o segundo método, Fenol-sulfúrico, resulta na quantificação dos açúcares totais na amostra, pois ele desidrata todos os tipos de açúcares, desde o monossacarídeo simples até o pentassacarídeo, sendo assim um método mais específico, pois furfural e hidroximetilfurfural é decorrente da desidratação de açúcares. Já no caso do DNS, outras substâncias redutoras podem interferir no resultado; para complementar os testes, a cromatografia de camada delgada mostra o perfil qualitativo da amostra, o perfil dos oligossacarídeos. Após a realização dos métodos e cromatografia, nota-se que em todas condições de pressão e pH que as amostras foram submetidas, houve a produção de oligossacarídeos, mas em destaque, a casca de trigo em 7 atm mostrou uma maior concentração de açúcares redutores, uma maior concentração de açúcares totais na amostra e no perfil da CCD, mostrou um perfil mais intenso de oligossacarídeos.

Sendo assim, os resultados mencionados no tópico de Amostras Padrão de Oligossacarídeos (item 5.2), confirmam essa maior produção de oligossacarídeos na casca de trigo comparado a casca de soja.

A casca de trigo tem o maior potencial para produção de oligossacarídeos em larga escala, e tem a presença de sílica na sua composição. Mas de acordo com Saúde e Fitness (2012), a presença desse elemento em alimentos é muito importante para o desenvolvimento ósseo, e a presença da sílica no corpo humano ajuda a manter a pele, cabelo e unhas mais saudáveis. Especialistas sugerem a dose diária de silício de 20 – 30 mg necessária na dieta para manter a saúde, principalmente os cereais são ricos em sílica. Os alimentos de origem vegetal contêm um teor de silício muito maior que os de origem animal. BioMarkan (2016) comenta sobre a deficiência de silício que pode aumentar a susceptibilidade a doenças, como: artrite degenerativa e arteriosclerose; bem como o envelhecimento precoce da pele e a fragilidade das

unhas. Logo a presença de sílica na casca de trigo não representa um problema, e sim, é considerável ideal para esse requisito prebiótico, para melhorar a saúde.

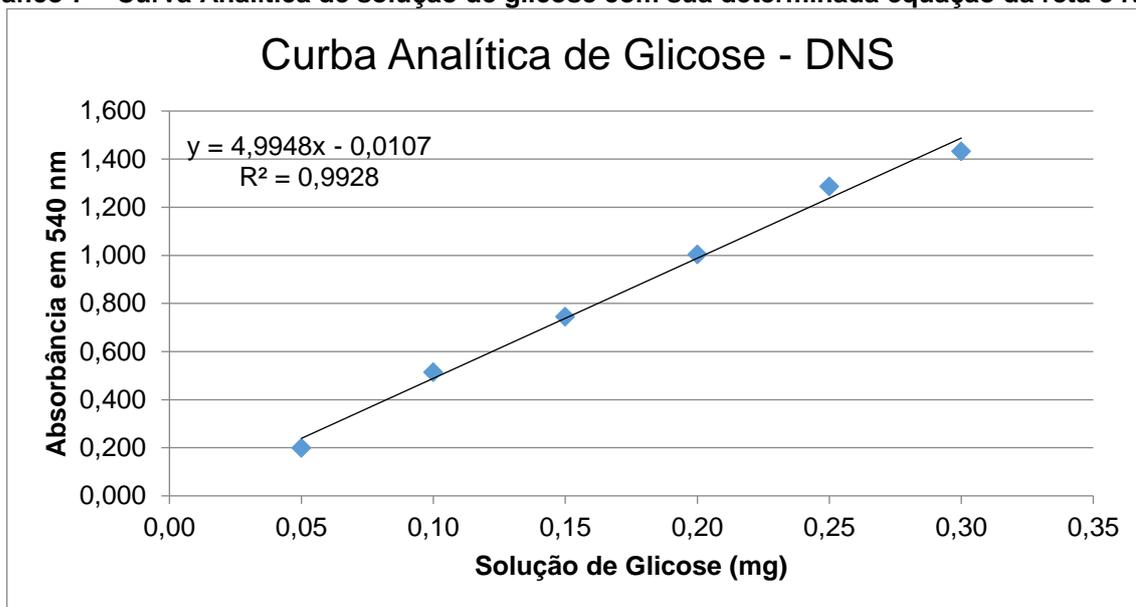
5.5 RESÍDUOS LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS – L(H)C INSOLÚVEIS

A biomassa ligno(hemi)celulósica insolúvel (celulose residual) foi analisada através das etapas de sacarificação enzimática, fermentação alcoólica e quantificação do bioetanol conforme método já apresentado, processos esses que permitiram a obtenção dos seguintes resultados:

5.5.1 Sacarificação Enzimática

Os principais objetivos da hidrólise enzimática são a quebra da celulose residual em moléculas menores, principalmente glucose, com auxílio de enzimas e, simultaneamente, a descoberta das melhores condições de pressão e pH de cada biomassa em análise, ou seja, com alto poder de sacarificação para posterior etapa de fermentação alcoólica.

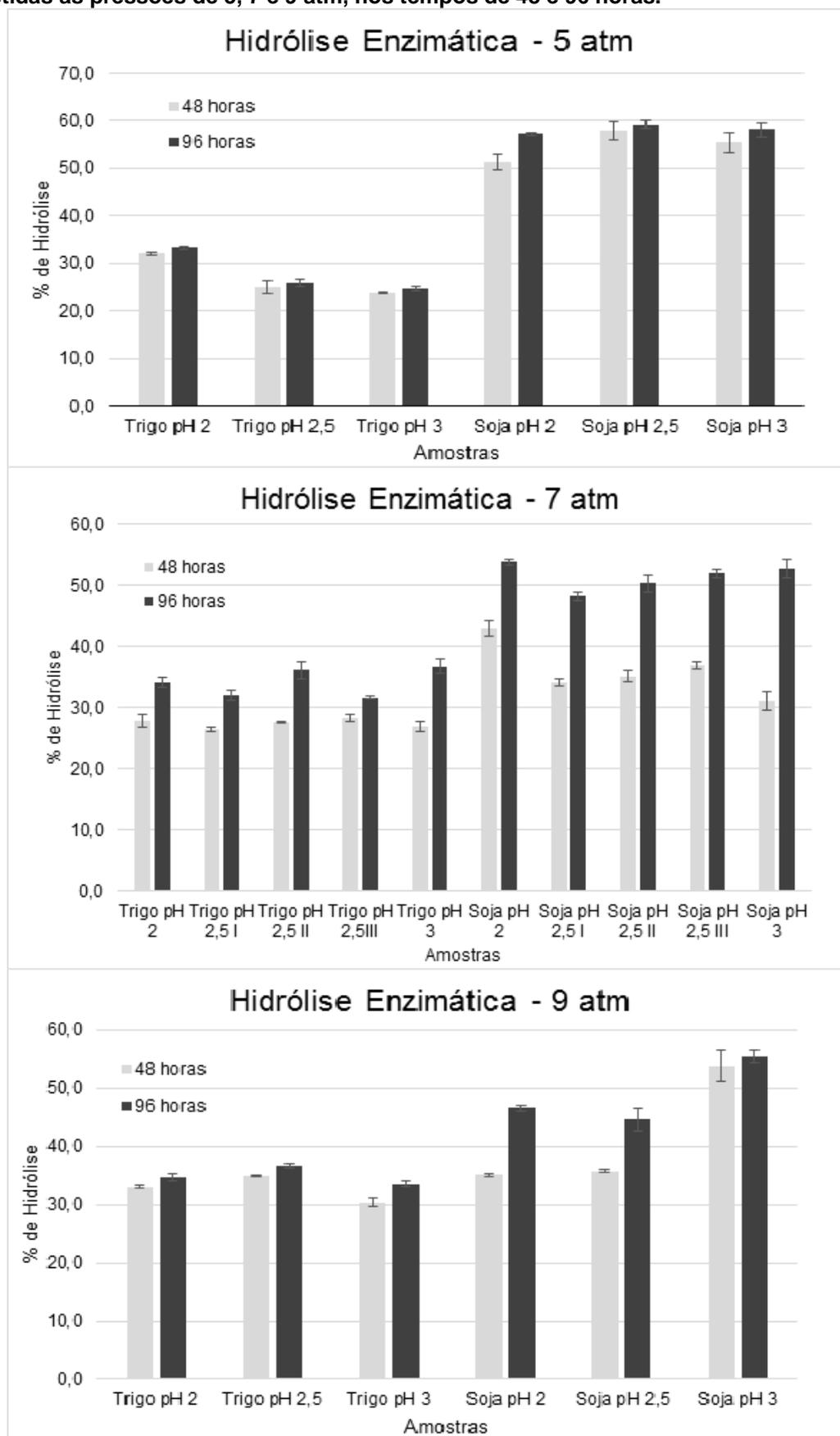
Se fez necessário a construção de uma curva analítica de glicose (Gráfico 7) para cálculo das concentrações de açúcares redutores nas biomassas estudadas, bem como a porcentagem de hidrólise de cada alíquota analisada.

Gráfico 7 – Curva Analítica de solução de glicose com sua determinada equação da reta e R².

Fonte: Autoria própria.

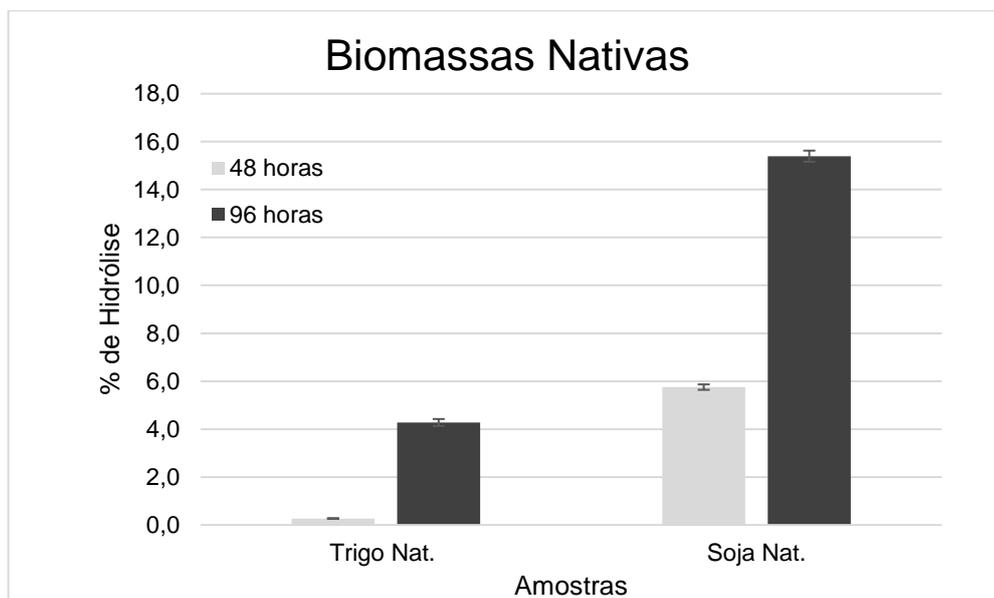
Para melhor gestão dos resultados, separou-se os dados pelas diferentes pressões utilizadas (5, 7 e 9 atm), analisando inclusive a biomassa nativa (sem pré-tratamento ácido – Gráfico 9). Além disso, esta etapa foi realizada com recolhimento de alíquotas em dois tempos – 48h e 96h, conforme Gráficos 8.

Gráfico 8 – Porcentagem de Hidrólise nas amostras analisadas em diferentes pH (2, 2,5 e 3) submetidas as pressões de 5, 7 e 9 atm, nos tempos de 48 e 96 horas.



Fonte: Autoria própria.

Gráfico 9 – Porcentagem de Hidrólise nas cascas de trigo e soja nativa nos tempos de 48 e 96 horas.



Fonte: Autoria própria.

Os melhores resultados obtidos a partir do cruzamento das informações acima apresentadas e de suas observações permitiram fazer a escolha pelas amostras com alto poder de sacarificação que seriam utilizadas na sequência do estudo, tanto para a casca de trigo quanto para casca de soja, padronizando-se aquelas submetidas: a 5 atm e pH 2; a 7 atm e pH 2,5 II; a 9 atm e pH 3, as escolhidas para a próxima etapa de Fermentação Alcoólica (item 5.4.2).

A partir do método de DNS, ambas as biomassas apresentaram aumento do potencial hidrolítico: para o trigo em 48 horas comparado a melhor condição (9 atm pH 2,5) de 100 vezes comparado ao nativo e em 96 horas o aumento foi de quase 10 vezes; para a soja em 48 horas comparado a melhor condição (5 atm pH 2,5) de 9 vezes comparado ao nativo e em 96 horas o aumento foi de 4 vezes. Pode-se dizer que em 48 horas de experimento as enzimas hidrolisaram grande parte da celulose residual em moléculas menores como glucose.

De acordo com os gráficos, nota-se que pós hidrólise oPA, a casca de soja tem maior porcentagem de hidrólise comparado a casca de trigo, ou seja, a casca de soja possui, nas condições experimentadas, maior concentração de glucose livre para próxima etapa de fermentação, tanto em 48 horas quanto em 96 horas.

Podemos observar no Gráfico 9, essa diferença de porcentagem de hidrólise entre as biomassas nativas analisadas. Aparenta que em 48 horas, a casca de soja possui potencial de sacarificação de 19 vezes maior que a casca de trigo, em 96 horas

essa diferença cai para 3,6 vezes. Mas em ambos os tempos, a casca de soja mostrou-se superior neste requisito, mesmo sem qualquer pré-tratamento imposto a biomassa. A explicação para essa grande diferença está relacionado ao fato da casca de trigo ser mais lignificada (20,32%) do que a casca de soja (6,37%), já que a lignina é considerada uma barreira forte para hidrólise enzimática, sendo assim, a casca de trigo é considerada uma matéria-prima mais recalcitrante para ação das enzimas (ZHU, 2010).

O teor médio de conversão de celulose residual em glucose livre para a casca de soja neste trabalho foi entre 45 – 60% em 96 horas dependendo das condições experimentadas, algumas conversões foram relatadas na literatura entre 50 – 80% (PURI, 2013; MODENBACH, 2013; WANG, 2012). A conversão depende de uma variedade de fatores, tais como a fonte da biomassa, o tipo de pré-tratamento utilizado, as condições utilizadas para a hidrólise celulolítica, as cargas de enzimas utilizadas, entre outros. O conversão parcial da celulose em glucose obtida por Rojas et al (2014), utilizando como pré-tratamento o ácido sulfúrico diluído (3%), para a casca de soja foi cerca de 55% entre 48 – 72 horas. Então o valor obtido nos experimentos está dentro do esperado.

Por fim, o teor médio de conversão de celulose residual em glucose livre para a casca de trigo neste trabalho foi entre 30 – 36 % em 96 horas dependendo das condições experimentadas, na literatura não consta artigo falando sobre a produção de etanol a partir da casca de trigo, apenas da palha de trigo e farelo de trigo. Logo para a palha de trigo, de acordo com Wang *et al* (2014), obtiveram um teor de glucose livre de 68,7% em 72 horas utilizando um pré-tratamento com ácido fosfórico concentrado, e para Li et al (2009) a palha de trigo utilizando um pré tratamento com líquidos iônicos, conseguiram um teor de glucose livre de 52,5% em 24 horas. Para o farelo de trigo, obtiveram uma conversão de celulose em glucose de 63%, passando um por pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em altas temperaturas e duas hidrólises enzimáticas (FAVARO, 2012). De acordo com Favaro *et al* (2013), utilizando ácido sulfúrico em alta temperatura como pré-tratamento, obtiveram um teor de 50,8% de açúcar livre em 72 horas, para próxima etapa de fermentação. A vantagem do farelo de trigo é pelo fato de terem uma porcentagem de lignina muito baixa entre 2 – 5%. Mas como podemos ver, tudo depende do método de pré-tratamento utilizado, da composição química do material, da quantidade de enzima adicionada para hidrólise enzimática. Neste trabalho, para visualizar a diferença de produção de etanol entre as

amostras, foi utilizado um teor baixo de enzimas e no caso da casca de trigo que contém um alto teor de lignina constatou-se uma baixa produção de etanol comparado a casca de soja, no qual tem um baixo teor de lignina.

5.5.2 Fermentação alcoólica

As observações descritas nos itens subsequentes foram resultantes da fermentação alcoólica, cuja metodologia já exposta no item 4.5.2.

5.5.2.1 Meio de cultivo e microrganismos

Esta etapa permitiu a observação dos crescimentos dos microrganismos no meio de cultivo, conforme possível visualizar abaixo nas Figuras de 19.

Figura 19 – Foto do crescimento das cepas, em meio de glicose, utilizadas nos experimentos de Fermentação Alcoólica.

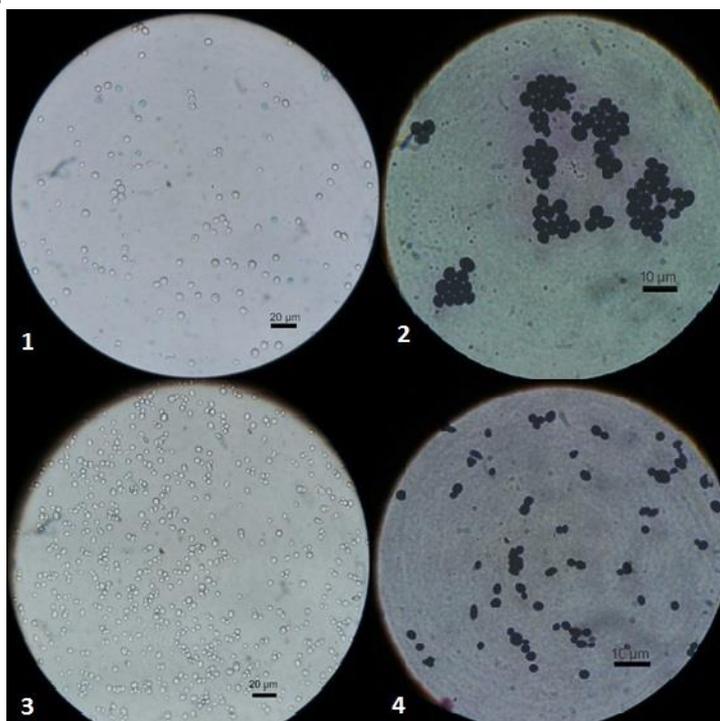


Nota: 1. Identificação do microrganismo de *Sacharomyces cerevisiae* – Fcr. PE2; 2. Crescimento da *Sacharomyces cerevisiae* – Fcr. PE2; 3. Identificação do microrganismo de *Pichia stipitis* – CBS 6054 USDA; 4. Crescimento da *Pichia stipitis* – CBS 6054 USDA.

Fonte: Autoria própria.

Nota-se que nas fotos do crescimento, os microrganismos possuem um aspecto cremoso, provando seu desenvolvimento sem impurezas. A pureza também pode ser observada através das imagens obtidas em Microscópio Ótico (1 μm – 1 mm) reproduzidas nas Figuras de 20, feitas sob método de Coloração de Gram. Outras importantes observações possíveis dizem respeito ao formato e tamanho das células das cepas utilizadas.

Figura 20 – Fotos das cepas utilizadas nos experimentos de Fermentação Alcoólica em Microscópio Ótico.



Nota: 1. Cepa de *Sacharomyces cerevisiae* fresca; 2. Cepa de *Sacharomyces cerevisiae* pelo método de Coloração de Gram; 3. Cepa de *Pichia stipitis* fresca; 4. Cepa de *Pichia stipitis* pelo método de Coloração de Gram.

Fonte: Autoria própria.

5.5.2.2 Fermentação alcoólica da celulose sacarificada

Durante a etapa de fermentação alcoólica obteve-se amostras em eppendorfs nos tempos: 0h, 24h, 48h e 72h necessárias a continuação dos experimentos.

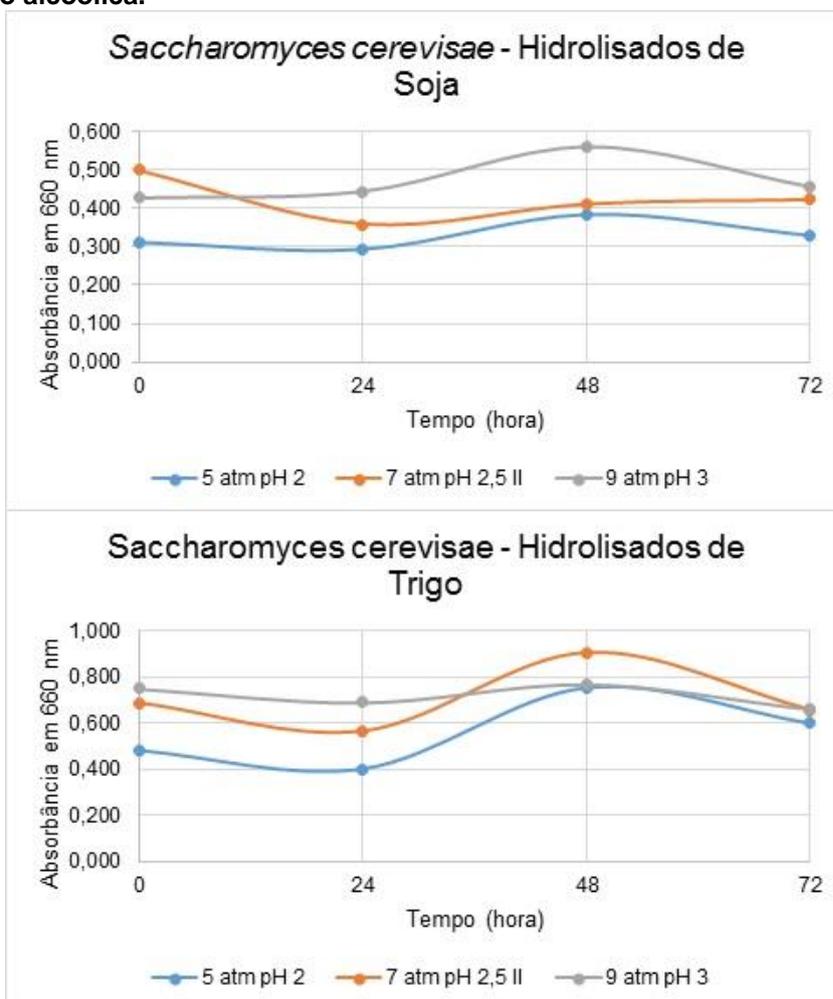
Após os eppendorfs serem centrifugados a 14.000 rpm (16654 *g-force*), durante 5 minutos (Eppendorf; Mini Spin Plus), foi separado o precipitado (células da

cepa + celulose residual) do sobrenadante (bioetanol produzido pelas cepas na fermentação).

5.5.2.3 Crescimento microbiano

Nesta etapa do experimento, foi utilizado a fração precipitada (células da cepa + celulose residual), a amostra foi resuspensa e analisada pelo método de turbidimetria, tanto para casca de soja quanto para de trigo, onde realizou-se uma curva do crescimento microbiano indireto (Gráficos 10). O microrganismo observado foi a *Saccharomyces cerevisiae* durante o tempo de 0h, 24h, 48h e 72h da fermentação alcoólica, nas seguintes condições: 5 atm pH 2; 7 atm pH 2,5 II; 9 atm pH 3.

Gráfico 10 – Crescimento da *S. cerevisiae* indireto dos hidrolisados de soja e trigo durante a fase de fermentação alcoólica.



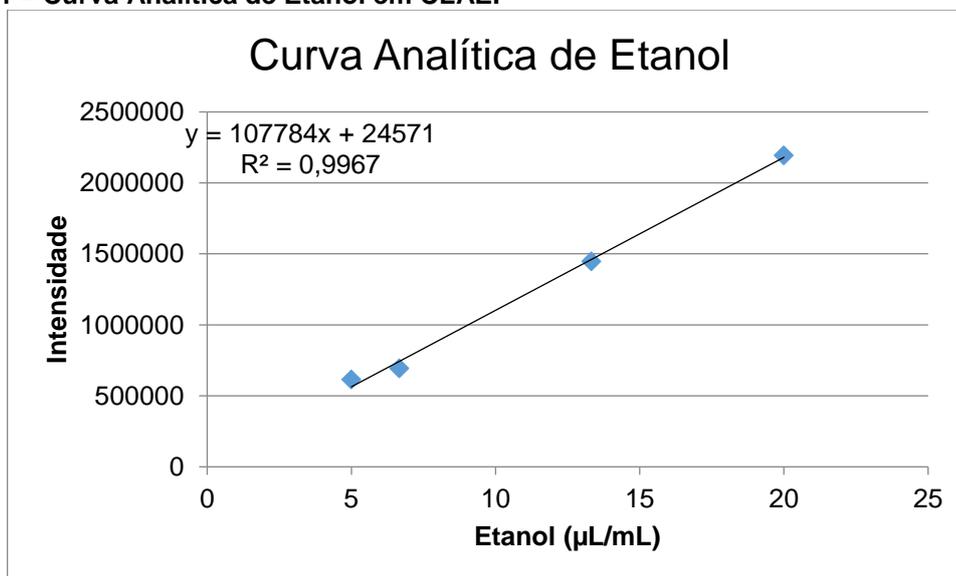
Fonte: Autoria própria.

De acordo com Gráfico 10, para os hidrolisados de soja e trigo, respectivamente, é possível observar que entre 24 – 48 horas houve um leve crescimento microbiano onde chegou seu ápice, no caminho de 72 horas teve declínio, onde ocorreu morte celular. Analisando os dois gráficos acima, pode-se deduzir que a produção de etanol ocorreu entre 24 – 48 horas para as duas biomassas experimentadas, pois nesse intervalo de tempo mostrou o crescimento dos microrganismos e a fermentação etanólica, indicando o consumo dos açúcares livres em consequência a produção de etanol. Mas como foi comentado antes, é um crescimento indireto, logo uma estimativa da faixa de tempo que houve esse crescimento microbiano.

5.5.3 Quantificação do Bioetanol

Primeiramente, construí-se uma curva analítica de concentrações de etanol conhecidas (5 – 20 $\mu\text{L/mL}$), ilustrado no Gráfico 11.

Gráfico 11 – Curva Analítica de Etanol em CLAE.



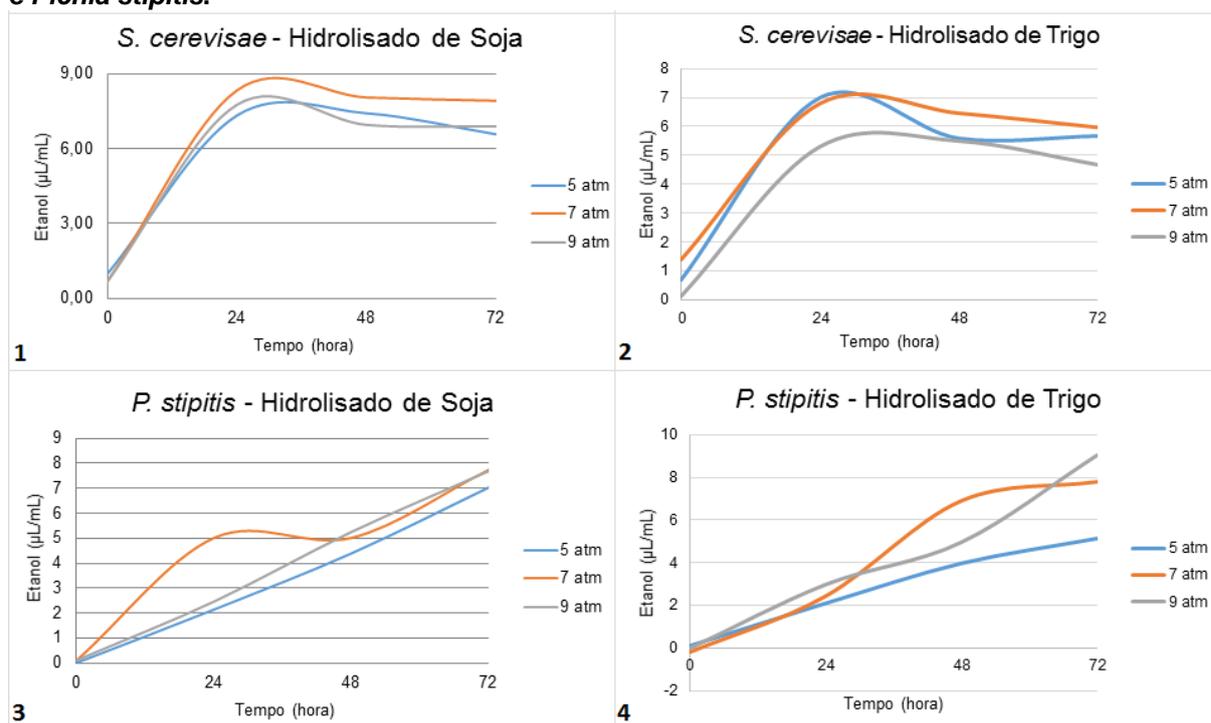
Fonte: Autoria própria.

Para esta etapa, utilizou-se as amostras sobrenadantes que foram diluídas e filtradas com membrana de 0,45 μm , assim analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Com base na curva analítica, calculou-se as concentrações

reais de etanol nas amostras fermentadas pelos microrganismos de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis* no decorrer do tempo (0 – 72 horas) para os hidrolisados de soja e trigo nas diferentes condições submetidas.

Com os resultados da concentração de etanol ($\mu\text{L/mL}$) em decorrer do tempo, plotou-se os Gráficos 12 para as duas biomassas analisadas.

Gráfico 12 – Concentração de etanol em decorrer do tempo (0 – 72 horas) para o hidrolisado de soja e trigo a partir da fermentação alcoólica com o microrganismo de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis*.



Nota: 1. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* para o hidrolisado de Soja; 2. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* para o hidrolisado de trigo; 3. Cepa de *Pichia stipitis* para o hidrolisado de soja; 4. Cepa de *Pichia stipitis* para o hidrolisado de trigo.

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os gráficos de *S. cerevisiae* (1 e 2), para ambas as biomassas, a produção de etanol teve um ápice entre 24 – 48 horas, nas melhores condições de 7 – 8,4 $\mu\text{L/mL}$, depois disso declinou um pouco e se manteve estável até 72 horas, entre 6 – 8 $\mu\text{L/mL}$.

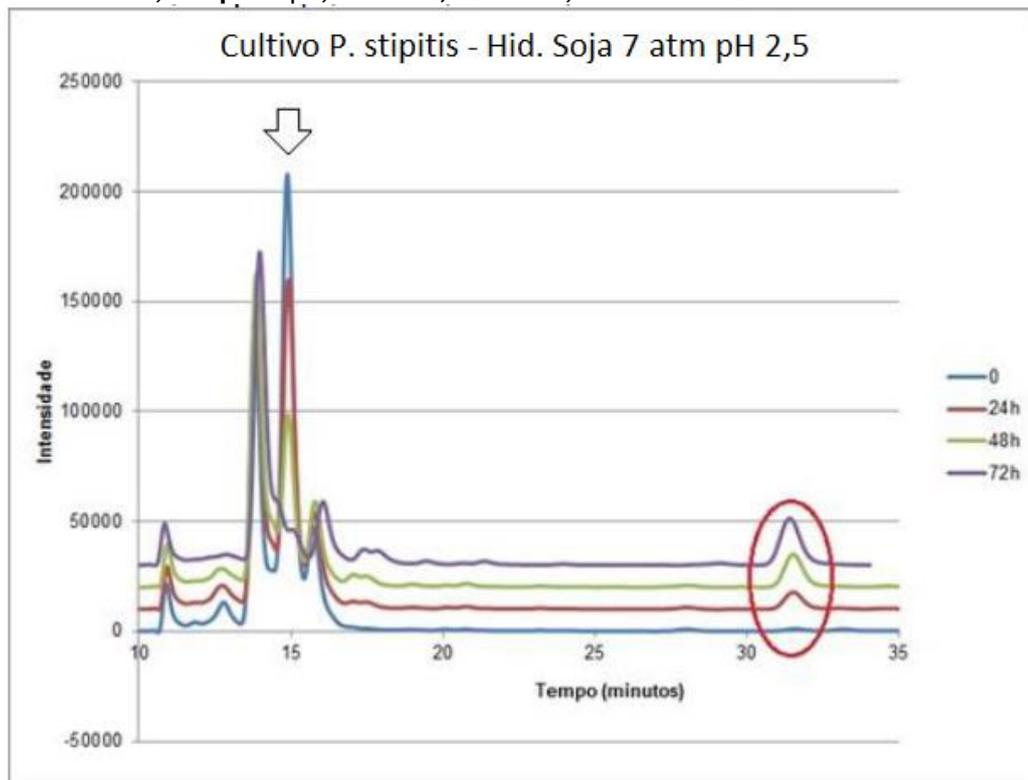
Já de acordo com os gráficos de *P. stipitis* (3 e 4), para ambas as biomassas analisadas, a produção de etanol teve um aumento crescente durante o tempo 0 - 72 horas. Para a casca de soja as três pressões na qual foi submetida ao chegar em 72 horas, a concentração de etanol ficou entre 7 – 8 $\mu\text{L/mL}$; para a casca de trigo nas

pressões de 7 e 9 atm, a concentração de etanol ficou entre 7,8 – 9 $\mu\text{L/mL}$, já para 5 atm ficou em média de 5,1 $\mu\text{L/mL}$.

Comparando a eficiência dos dois microrganismos (*Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis*) utilizados para a produção de etanol a partir de resíduos ligno(hemi)celulósicos pré-tratados e hidrolisados enzimaticamente, pode-se dizer que a *P. stipitis* manteve-se uma linha crescente de tempo vs. Concentração de etanol. Caso o microrganismo permaneça mais tempo em fermentação, só será capaz de produzir até uma quantidade máxima, pois o etanol é considerado uma substância tóxica a ele. A partir de um determinado momento tal concentração de etanol diminuirá, porque o microrganismo o utilizará como fonte de carbono. Mas relacionando ao custo-benefício para uma escala industrial (“tempo é dinheiro”), a *S. cerevisiae* é mais eficiente, pois obteve seu ápice logo em 24 horas, baixo tempo e alta concentração de etanol, pelo fato dele tolerar melhor a toxicidade do etanol.

O gráfico a seguir (Gráfico 13) é um exemplo específico de uma condição que o hidrolisado de soja foi submetido (7 atm pH 2,5 II), fermentado por *Pichia stipitis*. Todos os tempos começaram em 0, apenas estão um acima do outro para melhor entendimento e o pico de etanol circulado em vermelho. Assim podemos ver que na linha azul (0 horas), há o pico mais alto de monossacarídeo e nenhum pico de etanol, mas com o decorrer do tempo, o pico de monossacarídeos foi diminuindo ou sendo consumido, e assim aparecendo o pico de etanol no cromatograma, ou seja, produção de etanol.

Gráfico 13 – Cromatograma do cultivo de *Pichia stipitis* com o hidrolisado de soja a 7 atm e pH 2,5 II. Eluição feita em cromatografia líquida de Alta eficiência (CLAE); Fase Móvel: ácido sulfúrico 8 mmol/L; Loop: 20 μ L; Fluxo: 0,5 mL/min; Detector: RID.



Nota: (i) Seta no gráfico demonstra o pico da glucose livre; (ii) Pico de etanol circulado em vermelho.

Fonte: A autoria própria.

6 CONCLUSÃO

As melhores condições de pré-tratamento oPA, afim de elevar o poder de sacarificação com intuito da produção de etanol na etapa final, para o resíduo de casca de trigo foi com termopressurização de 7 atm e pH entre 2,5 – 3, mas obtendo um alto teor também em 9 atm e pH 2,5. Já para o resíduo de casca de soja as melhores condições foram em 5 atm nos três pH (2, 2,5 e 3) experimentados, mas bem próximo a esses valores adveio da termopressurização de 9 atm e pH 3.

Já se tratando da liberação de maior concentração de oligossacarídeos na fração solúvel, para os dois resíduos estudados, as melhores condições do pré-tratamento oPA foram a termopressurização a 7 atm e pH 2,5. O estudo mostrou também que a hemicelulose do hidrolisado de trigo possui concentrações de açúcares redutores e totais, e um perfil de OS mais intenso do que os oriundos do hidrolisados de soja.

O pré-tratamento da biomassa com ácido O-fosfórico diluído termopressurizado – considerado da classe dos ácidos mais brandos, para que não haja dano à celulose do resíduo ligno(hemi)celulósico e nem mesmo às hemiceluloses mais ácido lábeis – foi considerado eficaz para o aumento do potencial hidrolítico enzimático subsequente em todas as condições experimentadas em ambas as biomassas. Em 96 horas com 16 $\mu\text{L/mL}$ de enzimas celulolíticas na etapa final de fermentação etanológica, a casca de trigo hidrolisada já tinha uma porcentagem de hidrólise enzimática de pelo menos 5,7 vezes maior que a nativa, e para a casca de soja hidrolisada foi de pelo menos 2,9 vezes em relação a nativa.

A casca de soja é um resíduo ligno(hemi)celulósico com maior acessibilidade à sacarificação enzimática em relação a casca de trigo, até mesmo comparando entre as amostras nativas – 3,6 vezes.

A partir dos altos percentuais de hidrólise, se promoveu a fermentação etanólica, utilizando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis*. O primeiro microrganismo mostrou-se mais eficiente, para produção de etanol, em baixo tempo de experimento, alcançando níveis 8,35 $\mu\text{L/mL}$ de amostra para a casca de soja e 7 $\mu\text{L/mL}$ de amostra para a casca de trigo. A produção de etanol do segundo microrganismo mostrou uma linha crescente com o passar do tempo, alcançando

níveis de etanol iguais ou maiores do que o primeiro, mas apenas em 72 horas de experimento.

Para *Saccharomyces cerevisiae*, no hidrolisado de soja e trigo, todas as condições experimentadas se mantiveram bem próximas, com um leve destaque da termopressurização de 7 atm e pH 2,5. Para a *Pichia stipitis*, no hidrolisado de soja e trigo, todas as condições mantiveram a linha crescente de produção, tendo leves variações durante o tempo, mas 7 atm pH 2,5 e 9 atm pH 3 tiveram um destaque no final de 72 horas comparado a 5 atm pH 2.

Os resultados obtidos com o desenvolvimento deste projeto foram suficientes para comprovar a eficiência da produção de bioetanol a partir das matérias-primas, tendo em destaque a casca de soja para esse objetivo. Além disso, comprovaram a produção de oligossacarídeos prebióticos, a partir da hemicelulose, com destaque da casca de trigo para esse requisito.

A utilização de resíduos ligno(hemi)celulósicos para a produção de biocombustíveis e oligossacarídeos prebióticos é realmente uma alternativa viável e a tecnologia de hidrólise parcial ou total de hemiceluloses por via fosfórica diluída e termopressurizada., antes desenvolvida e aperfeiçoada no LQBB-UFPR-UTFPR uma vez mais se confirmou como opção industrial válida.

REFERÊNCIAS

ALBERSHEIM, P. et al. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. **Carbohydrate Research**, v. 5, p. 340 – 345, 1967.

ANJO, D. F. C. Functional foods in angiology and vascular surgery. **Jounal Vascular Brasileiro**, v. 3, p. 145 – 154, 2004.

ANVISA. **Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde**. 2014. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/> >. Acesso em: 15 de outubro de 2015.

ARRANJO PRODUTIVO LOCAL DO ÁLCOOL, **Brasil terá 2 usinas de etanol celulósico até 2015**. Disponível em: <<http://www.apla.org.br/brasil-tera-3-usinas-de-etanol-celulosico-ate-2015>>. Acesso em: 29 de outubro de 2015.

AVCI, A. *et al.* High temperature dilute phosphoric acid pretreatment of corn stover for furfural and ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 478 – 484, 2013.

BARTLE, J.R., ABADI, A. Toward sustainable production of second generation bioenergy feedstocks. **Energy Fuels**, v. 24, p. 20 – 29, 2010.

BEHERA, S. *et al.* Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 91 – 106, 2014.

BIOMARKAN – SOLUÇÕES ORGANICAS, **Silício na Agricultura e a Saúde humana**. Disponível em: <<http://biomarkan.com.br/silicio-na-agricultura-e-saude-humana/>>. Acesso em: 24 de outubro de 2016.

BLAUT, M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. **European Journal of Nutrition**, v. 41, p. I/11 – I/16, 2002.

BLEDZKI, A.K. *et al.* Physycal, chemical and surface properties of wheat husk, rye husk and soft wood and their polypropylene composites. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 41, p. 480 – 488, 2010.

BORGER, P. **Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada**. 2008. 162 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

BRIENZO, M. **Extração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos**. 2010. (Tese de doutorado). Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2010.

CANAL RURAL, **Raízen inaugura usina de etanol celulósico em São Paulo**. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/noticias/cana/raizen-inaugura-usina-etanol-celulosico-sao-paulo-57750>>. Acesso em: 29 de outubro de 2015.

CARVALHO, A. F. A. *et al.* Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, p. 75 – 85, 2013.

CARVALHO, L. **Produção de biocombustíveis a partir da biomassa de Dendê**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – M.Sc.) – Setor de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

CARVALHO, W. C. **Técnicas Médicas de Hematologia e Imuno-Hematologia**. Belo Horizonte, Coopmed editora, 1994.

CASSALES, A. *et al.* Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potencial substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 4675 – 4683, 2011.

CASTRO, E. *et al.* Optimization of dilute-phosphoric-acid steam pretreatment of *Eucalyptus benthamii* for biofuel production. **Appl. Energy**, v. 125, p. 76 – 83, 2014.

CELULOSE ONLINE, **Entra em operação primeira usina de etanol celulósico do Brasil**. Disponível em: <<http://celuloseonline.com.br/entra-em-operacao-primeira-usina-de-etanol-celulosico-do-brasil/>>. Acesso em: 27 de outubro de 2015.

CHIARAMONTI, D. *et al.* Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 25 – 35, 2012.

CHU, C.Y. *et al.* Kinetics of cotton cellulose hydrolysis using concentrated acid and fermentative hydrogen production from hydrolysate. **International Journal Hydro. Energy**, v. 36, p. 8743 – 8750, 2011.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 12, p. 1 – 182. Safra 2015/16. Décimo Segundo levantamento, Brasília, setembro 2016.

CONDE-MEJÍA, C.; JIMÉNEZ-GUTIÉRREZ, A.; EL-HALWAGI, M. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 90, p. 189 – 202, 2012.

COOPERATIVA AGROPECUÁRIA SUDOESTE LTDA, **Brasil pode colher a maior safra de trigo da história em 2014/2015**. Disponível em: <<http://www.coasul.com.br/brasil-pode-colher-a-maior-safra-de-trigo-da-historia-em-20142015/>>. Acesso em: 03 de novembro de 2015.

CUI¹, J. *et al.* Preparation of siliceous lignin microparticles from wheat husk with a facile method. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 689 – 696, 2015.

CUI², J. *et al.* Preparation of low surface area SiO₂ microsphere from wheat husk ash with a facile precipitation process. **Materials Letters**, v. 156, p. 42 – 45, 2015.

DAS NEVES, M.A. *et al.* Production of alcohol by simultaneous saccharification and fermentation of low-grade wheat flour. **Braz. Arch. Biol. Technology**, v. 49, p. 481–490, 2006.

DE VASCONCELOS, S.M. *et al.* Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 46 – 52, 2013.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 105, p.1058 – 1068, 2010.

FAVARO, L., BASAGLIA, M., CASELLA, S. Processing wheat bran into ethanol using mild treatments and highly fermentative yeasts. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 605 – 617, 2012.

FAVARO, L. *et al.* Using an efficient fermenting yeast enhances ethanol production from unfiltered wheat bran hydrolysates. **Applied Energy**, v. 102, p. 170 – 178, 2013.

FERREIRA-LEITAO, V. *et al.* Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, p. 65 – 76, 2010.

FIESP – FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, **Safra Mundial de Soja 2016/17 – 3º Levantamento da USDA**. Elaboração do Departamento de Agronegócio – DEAGRO/FIESP. Disponível em: <http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-soja/attachment/boletim_soja_julho2016/>. Acesso em: 10 de agosto de 2016.

FONSECA, B. *et al.* Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 199 – 207, 2011;

FONTANA, J. D. **Celulose 1 - Algodão em alta**. O Estado do Paraná. Curitiba 2004.

FONTANA, J. D. *et al.* Diluted thermopressurized phosphoric acid as a gentle proton donor for the hydrolysis of polysaccharides from several phytobiomass models: softwood heteromannans as target. **35th SBFC – Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**, 2013, Portland-OR-USA. April-29/May 2, 2013 .

FONTANA, J. D.; CORREA, J. B. C.; DUARTE, J.H. Aqueous phosphoric acid hydrolysis of hemicelluloses from sugarcane and sorghum bagasses. **Biotechnology and Bioengineering Symp.**, v. 14, p. 175 – 186, 1984a.

FONTANA, J. D.; CORREA, J. B. C.; DUARTE, J.H., *et al.* Aqueous phosphoric acid hydrolysis of hemicelluloses from sugarcane and sorghum bagasses. **Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals.**, v. 14, p. 175 – 186, 1984b.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 70 – 78, 2012.

GÁMEZ, S. *et al.* Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 78 – 88, 2006.

GAO, Y. *et al.* Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 396 – 400, 2013.

GELFAND, I. *et al.* Sustainable bioenergy production from marginal lands in the US Midwest. **Nature**, v. 493, p. 514 – 517, 2013.

GIESE, E. *et al.* Produção, propriedades e aplicações dos aligossacarídeos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 683 – 700, 2011.

GIRIO, F.M. *et al.* Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775 – 4800, 2010.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10 – 18, 2009.

HILPMANN, G. *et al.* Acid hydrolysis of xylan. **Catalysis Today**, v. 259, p. 376 – 380, 2016.

HIRAKURI, M.; LAZZAROTTO, J. J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. **Documentos 349 – EMBRAPA Soja**, 2014.

IBELLI, R. C. **Etanol de segunda geração pode dar independência ao país.** Disponível em: http://www.dcomercio.com.br/categoria/tecnologia/etanol_de_segunda_geracao_pod_e_dar_independencia_energetica_ao_pais>. Acesso em: 08 de outubro de 2016.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, **Statistics.** Disponível em: <<http://www.iea.org/statistics/>>. Acesso em: 30 de outubro de 2015.

JORNAL CANA, **Raízen inaugura usina de etanol 2G.** Disponível em: <<https://www.jornalcana.com.br/raizen-inaugura-usina-de-etanol-2g/>>. Acesso em: 29 de outubro de 2015.

KELBERT, M. *et al.* Lignocellulosic bioethanol production with revalorization of low-cost agroindustrial by-products as nutritional supplements. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 16 – 24, 2015.

KIM, Y., MOSIER, N.S., LADISCH, M.R. Enzymatic digestion of liquid hot water pretreated hybrid poplar. **Biotechnology Progress**, v. 25, p. 340 – 348, 2009.

KO, J.K. *et al.* Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, p. 252 – 262, 2015.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, p. 377 – 391, 2008.

LABORATÓRIO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO BIOETANOL, **Etanol celulósico deve ser economicamente viável em 2020**. Disponível em: <<http://ctbe.cnpem.br/etanol-celulosico-deve-ser-viavel-2020/>>. Acesso em: 29 de outubro de 2015.

LENIHAN, P. *et al.* Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, p. 395 – 403, 2010.

LENNARTSSON, P.R., ERLANDSSON, P., TAHERZADEH, M.J. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. **Bioresource Technology**, v. 165, p. 3 – 8, 2014.

LI, Q. *et al.* Improving enzymatic hydrolysis of wheat straw using ionic liquid 1-ethyl-3-methyl imidazolium diethyl phosphate pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3570 – 3575, 2009.

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

LOFRANO, R. *et al.* Métodos e Perspectivas Tecnológicas de Obtenção de Biocombustíveis de Primeira e Segunda geração. **e-xacta**, Belo Horizonte, v. 6, p. 35 – 53, 2013.

LÓPEZ-LINARES, J. C. *et al.* Fermentable sugar production from rapeseed straw by dilute phosphoric acid pretreatment. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 525 – 531, 2013.

LYND, L. R. *et al.* Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506 – 577, 2002.

MCMILLAN, J. D. Bioethanol production: Status and prospects. **Renewable Energy**, v. 10, p. 295 – 302, 1997.

MIELLENZ, J.R., BARDSLEY, J.S., WYMAN, C.E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3532 – 3539, 2009

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

MINEO, H. *et al.* Various Indigestible Saccharides Enhance Net Calcium Transport from the Epithelium of the Small and Large Intestine of Rats In Vitro. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 3243 – 3246, 2001.

MODENBACH, A.A., NOKES, S.E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – a review. **Biomass Bioenergy**, v. 56, p. 526 – 544, 2013.

MONIZ, P. *et al.* Assessment of the bifidogenic effect of substituted xylo-oligosaccharides obtained from corn straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 466 – 473, 2016.

MOOD, S. H. *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.

MOREIRA, I. *et al.* Avaliação nutricional da casca de soja com ou sem complexo enzimático na alimentação de leitões na fase inicial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 2408 – 2416, 2009.

MOURE, A. *et al.* Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1913 – 1923, 2006.

NAIR, R. B. *et al.* Dilute phosphoric acid pretreatment of wheat bran for enzymatic hydrolysis and subsequent ethanol production by edible fungi *Neurospora intermedia*. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 314 – 323, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

NOVA CANA, **116 fotos da 1ª usina de etanol celulósico do Brasil: 85% concluída**. Disponível em: <<http://www.novacana.com/fotos/granbio/>>. Acesso em: 28 de outubro de 2015.

NOVA CANA, **Etanol celulósico: CTBE e Novozymes atacam o custo das enzimas**. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/etanol-celulosico-ctbe-novozymes-atacam-custo-enzimas-030315/>>. Acesso em: 08 de outubro de 2016.

O'DWYER, M. H. The Structure of Hemicellulose B. **The Hemicelluloses of the Wood of English OAK**, 1939.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, p. 1549 – 1558, 2010.

OROZCO, A. M. *et al.* Dilute phosphoric acid-catalysed hydrolysis of municipal bio-waste wood shavings using autoclave parr reactor system. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9076 – 9082, 2011.

PÉREZ, S.; SAMAIN, D. Structure and Engineering of Celluloses. **Academic Press**, v. 64, p. 25 – 116, 2010.

PRÜCKLER, M. *et al.* Wheat bran-based biorefinery 1: composition of wheat bran and strategies of functionalization. **LWT-Food Science Technology**, v. 56, p. 211 – 221, 2014.

PURI, J.D., HEAVEN, S., BANKS, C.J. Improving the performance of enzyme inhydrolysis on high solid paper pulp derived from MSW. **Biotechnology Biofuels**, v. 6, p. 100 – 107, 2013.

RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 83 – 91, 2016.

RASTALL, R. A. Functional oligosaccharides: Application and manufacture. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 305 – 339, 2010.

RIGDON, A.R. *et al.* Impact of various storage conditions on enzymatic activity, biomass components and conversion to ethanol yields from sorghum biomass used as a bioenergy crop. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 269 – 275, 2013.

ROEHR, M. *et al.* **The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications**. Weinheim, Alemanha: WILEY – VCH, 2001.

ROJAS, M. *et al.* Sequential proteolysis and cellulolytic hydrolysis of soybean hulls for oligopeptides and ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 202 – 210, 2014.

SAMANTA, A. K. *et al.* Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, p. 62 – 71, 2015.

SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 89, p. 246 – 291, 2005.

SANTOS, F. *et al.* Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, São Paulo, 2012.

SAÚDE E FITNESS, **Dióxido de silício em alimentos**. Disponível em: <<http://saude-info.info/dioxido-de-silicio-em-alimentos.html>>. Acesso em: 24 de outubro de 2016.

SAXENA, I. M. *et al.* Biosynthesis of cellulose. In: (Ed.). **Progress in Biotechnology: Elsevier**, v. 18, p. 69 – 76, 2001.

SCHEUER, P. *et al.* Characterization of Brazilian wheat cultivars for specific technological applications. **Food Science and Technology**, v. 31, p. 816 – 826, 2011.

SILVA, C. *et al.* Biotransformation of Synthetic Fibers. In: (Ed.). **Encyclopedia of Industrial Biotechnology: John Wiley & Sons, Inc.**, 2009.

SILVA, N. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – M.Sc.) – Setor de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SINGH, R., *et al.* Catalytic hydrothermal upgradation of wheat husk. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 446-451, 2013.

SIRÓ, I. *et al.* Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance: A review. **Appetite**, v. 51, p. 456 – 467, 2008.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA, **Usina em Alagoas começa a produzir etanol celulósico de 2ª geração**. Disponível em: <<http://sna.agr.br/usina-em-alagoas-comeca-a-produzir-etanol-celulosico-de-2a-geracao/>>. Acesso em: 27 de outubro de 2015.

STAMATELATOU, K. *et al.* The effect of physical, chemical, and biological pretreatments of biomass on its anaerobic digestibility and biogas production. **Biogas production: Pretreatment methods in anaerobic digestion**. p. 55 – 90, 2012.

TAKATA, E. *et al.* Production of monosaccharides from napier grass by hydrothermal process with phosphoric acid. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 53 – 58, 2013.

TIBONI, M. **Produção de oligossacarídeos prebióticos a partir de diferentes pré-tratamentos de fitobiomassas**. 2015. 176 f. Tese (Doutorado em Ciência Farmacêutica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2015.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, **Etanol – Usina pioneira de etanol celulósico coloca Brasil entre líderes globais no uso da nova tecnologia**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/29810917920343378786/usina-pioneira-de-etanol-celulosico-coloca-brasil/>>. Acesso em: 28 de outubro de 2015.

VÁSQUEZ, M. **Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 205 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Setor de Ciências (DSc.), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

VIIKARI, L., VEHMAANPERA, J., KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: from scienceto industry. **Biomass Bioenergy**, v. 46, p. 13–24, 2012.

WANG, L., TEMPLER, R., MURPHY, R.J. High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. **Applied Energy**, v. 99, p. 23 – 31, 2012.

WANG, Q. *et al.* Pretreating lignocellulosic biomass by the concentrated phosphoric acid plus hydrogen peroxide (PHP) for enzymatic hydrolysis: Evaluating the pretreatment flexibility on feedstocks and particle sizes. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 420 – 428, 2014.

WANG, Z. *et al.* Colloidal behaviors of lignin contaminants: Destabilization and elimination for oligosaccharides separation from wood hydrolysate. **Separation and Purification Technology**, v. 145, p. 1 – 7, 2015.

XIAO, L., NING, J., XU, G.H. Application of Xylo-oligosaccharide in modifying human intestinal function. **Afr. J. Microbiol. Res.**, v. 6, p. 2116 – 2119, 2012.

ZAMBOM, M. *et al.* Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 23, p. 937 – 943, 2008.

ZANIN, G. M. *et al.* Brazilian Bioethanol Program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84 – 86, p. 1147 – 1161, 2000.

ZAPAROLLI, D. **GranBio - Duas usinas de etanol celulósico entrarão em operação este ano no Brasil**. Disponível em: <<http://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/usinas-etanol-celulosico-operacao-brasil-280414/>>. Acesso em: 20 de outubro de 2015.

ZARRINBAKSH, N., MOHANTY, A.K., MISRA, M. Fundamental studies on water-washing of the corn ethanol coproduct (DDGS) and its characterization for biocomposite applications. **Biomass Bioenergy**, v. 55, p. 251 – 259, 2013.

ZHANG, H.D., XU, S.H., WU, S.B. Enhancement of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse by liquid hot water pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 391 – 396, 2013.

ZHANG, Y. *et al.* Hemicellulose isolation, characterization, and the production of xylo-oligosaccharides from the wastewater of a viscose fiber mill. **Carbohydrate Polymers**, v. 141, p. 238 – 243, 2016.

ZHENG, Y. *et al.* Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas Production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, p. 35 – 53, 2014.

ZHU, J. Y., PAN, X. J. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4992 – 5002, 2010.

ZHUANG, X. *et al.* Decomposition behavior of hemicellulose and lignin in the step-change flow rate liquid hot water. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 206 – 218, 2012.

ZHUANG, X. *et al.* Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with valuable products. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 68 – 75, 2016.