

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

FELIPE AUGUSTO SANTOS

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Penicillium* sp. FSDE15 E HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DO SABUGO DE MILHO**

João Pessoa – PB

2021

FELIPE AUGUSTO SANTOS

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Penicillium* sp. FSDE15 E HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DO SABUGO DE MILHO**

João Pessoa – PB

2021

FELIPE AUGUSTO SANTOS

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Penicillium* sp. FSDE15 E HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DO SABUGO DE MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sharline Florentino de Melo Santos.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Laís Campos Teixeira de Carvalho-Gonçalves.

João Pessoa – PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237p Santos, Felipe Augusto.

Produção de celulases por *Penicillium* sp. FSDE15 e hidrólise enzimática do sabugo de milho / Felipe Augusto Santos. - João Pessoa, 2021.

87 f. : il.

Orientação: Sharline Florentino de Melo Santos.

Coorientação: Laís Campos Teixeira de Carvalho-Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Engenharia química - processos. 2. Biomassa lignocelulósica. 3. Fungo filamentosos. 4. Enzimas - Sabugo de milho - pré tratamento. 5. Hidrólise enzimática - sabugo de milho. 6. Etanol. I. Santos, Sharline Florentino de Melo. II. de Carvalho-Gonçalves, Laís Campos Teixeira. III. Título.

UFPB/BC

CDU 66.011(043)

FELIPE AUGUSTO SANTOS

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Penicillium* SP. FSDE15 E HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DO SABUGO DE MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

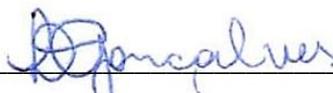
Aprovada em: 27/05/2021.

BANCA EXAMINADORA



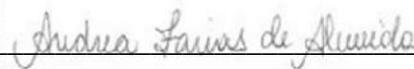
Prof^ª. Dr^ª. Sharline Florentino de Melo Santos – DEQ/CT/UFPB

(Orientadora)



Prof^ª. Dr^ª. Laís Campos Teixeira de Carvalho-Gonçalves – CTDR/UFPB

(Coorientadora)



Prof^ª. Dr^ª. Andrea Farias de Almeida – CBIOTEC/UFPB

(Avaliadora interna)



Prof^ª. Dr^ª. Solange Maria de Vasconcelos – CTDR/UFPB

(Avaliadora externa)



Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa – DEQ/CT/UFPB

(Avaliador interno)

AGRADECIMENTOS

A minha mãe e minhas irmãs pelo amor e apoio incondicionais.

Aos meus amigos do mestrado, Carol, Riann, Elder e Amanda, que fizeram com que essa caminhada se tornasse mais leve.

A minha orientadora Sharline Florentino e coorientadora Laís Campos, pelos inúmeros ensinamentos e paciência na orientação, e por estarem sempre disponíveis ao longo do processo.

A Lorena e Angela, por terem me auxiliado diversas vezes, principalmente durante os tempos de pandemia, onde todas as portas estavam fechadas.

E ao Fundo de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba, FAPESQ, pelo apoio financeiro concedido durante o programa.

RESUMO

Diante do cenário mundial, onde cada vez mais resíduos são gerados pelos diversos setores da indústria e da agricultura, uma atenção especial vem sendo dada ao reaproveitamento desses materiais, como sabugo e palha de milho e farelo de trigo. Uma das alternativas é a produção de produtos de alto valor agregado, como enzimas, a partir da utilização desses resíduos como substratos. Entre as diversas enzimas, destacam-se as celulases (CMCase, FPase e β -glicosidases), capazes de converter parte da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis, esses podem ser convertidos em etanol celulósico ou de segunda geração. Diante disso, este estudo teve como objetivo a produção de enzimas celulases, por meio do fungo filamentosso *Penicillium* sp. FSDE15, para realização da hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado visando a liberação de açúcares fermentescíveis para produção de etanol de segunda geração. Inicialmente foi realizado o pré-tratamento do sabugo de milho. Três tipos de pré-tratamento foram aplicados, sendo um ácido, um alcalino e um hidrotérmico. As condições aplicadas a cada tipo de pré-tratamento foram estabelecidas a partir de um planejamento fatorial experimental. No caso dos pré-tratamentos químicos, empregou-se um planejamento 2^3 com três repetições no ponto central, variando-se o tempo (10, 40 e 70 min), temperatura (40, 70 e 100 °C) e concentração de reagente (1, 2 e 3%). O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado seguindo um planejamento fatorial experimental de 2^2 com três repetições no ponto central, variando-se o tempo e a temperatura, sendo empregado o mesmo intervalo que o aplicado aos pré-tratamentos químicos. Por meio dos ensaios fermentativos (60% de umidade, temperatura ambiente e concentração de esporos de 10^6 esporos/mL), foi possível obter uma máxima produção de CMCase e FPase de 21,11 U/g e 1,29 U/g, respectivamente, em 216 h de fermentação, para cultivo realizado com farelo de trigo e sabugo de milho na proporção de 50%. A atividade β -glicosidase atingiu seu pico de 8,72 U/g em 216 h para cultivo realizado com farelo de trigo puro. Nos resultados de hidrólise enzimática do sabugo pré-tratado com H_2SO_4 , atingiu-se uma concentração de açúcares redutores (AR) de 23,07 g/L de glicose para a hidrólise com o extrato enzimático de *Penicillium* sp. FSDE15 e 47,62 g/L para a hidrólise utilizando a enzima comercial Celluclast®. Para o sabugo pré-tratado com NaOH, foi possível obter concentrações de 45,55 e 74,12 g/L de glicose, para as hidrólises utilizando o extrato enzimático e a celulase comercial, respectivamente. Já para o sabugo pré-tratado hidrotérmicamente, obteve-se 25,77 g/L de glicose para a hidrólise com o extrato de *Penicillium* e 21,34 g/L para a enzima Celluclast®. Todos os melhores valores de açúcares redutores foram atingidos em 48 h de hidrólise. Esses resultados, juntamente com o estudo do aumento de escala para a produção de bioetanol, demonstram que o sabugo pré-tratado hidrotérmicamente, aliado com o extrato enzimático produzido por *Penicillium* sp. FSDE15, possui grande potencial para a produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chave: biomassa lignocelulósica, fungo filamentosso, enzimas, pré-tratamento, hidrólise.

ABSTRACT

Given the world scenario, where more and more waste is generated by the various sectors of industry and agriculture, special attention has been given to the reuse of these materials, such as corncob and straw and wheat bran. One of the alternatives is the production of products with high added value, such as enzymes, using these residues as substrates. Among the various enzymes, cellulases stand out (CMCase, FPase and β -glucosidases), capable of converting part of the lignocellulosic biomass into fermentable sugars, which can be converted into cellulosic or second-generation ethanol. Therefore, this study aimed to produce cellulase enzymes through the filamentous fungus *Penicillium* sp. FSDE15, to carry out the enzymatic hydrolysis of the pretreated corncob aiming at the release of fermentable sugars for the production of second-generation ethanol. Initially, the pretreatment of the corncob was carried out. Three types of pre-treatment were applied, one acid, one alkaline and one hydrothermal. The conditions applied to each type of pretreatment were established from an experimental factorial design. In the case of chemical pretreatments, a 2^3 planning was used with three repetitions at the central point, varying the time (10, 40 and 70 min), temperature (40, 70 and 100 °C) and reagent concentration (1, 2 and 3%). The hydrothermal pretreatment was carried out following an experimental factorial design of 2^2 with three replications in the central point, varying the time and temperature, using the same interval as that applied to the chemical pretreatments. Through fermentation tests (60% moisture, ambient temperature and spore concentration of 10^6 spores/mL), it was possible to obtain a maximum production of CMCase and FPase of 21.11 U/g and 1.29 U/g, respectively, in 216 h of fermentation, for cultivation carried out with wheat bran and corncob in the proportion of 50%. The β -glucosidase activity reached its peak of 8.72 U/g in 216 h for cultivation carried out with pure wheat bran. In the results of enzymatic hydrolysis of corncob pretreated with H_2SO_4 , a concentration of reducing sugars of 23.07 g/L of glucose was reached for hydrolysis with the enzymatic extract of *Penicillium* sp. FSDE15 and 47.62 g/L for hydrolysis using the commercial enzyme Celluclast®. For the corncob pretreated with NaOH, it was possible to obtain concentrations of 45.55 and 74.12 g/L of glucose for hydrolysis using the enzymatic extract and commercial cellulase, respectively. As for the hydrothermally pretreated corncob, 25.77 g/L of glucose were obtained for hydrolysis with the *Penicillium* extract and 21.34 g/L for the Celluclast® enzyme. All the best reducing sugar values were reached within 48 h of hydrolysis. These results, together with the study of scale-up for the production of bioethanol, demonstrate that the hydrothermally pretreated corncob, combined with the enzymatic extract produced by *Penicillium* sp. FSDE15, has great potential for the production of second generation ethanol.

Keywords: lignocellulosic biomass, filamentous fungus, enzymes, pretreatment, hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta do milho.	17
Figura 2. Estrutura dos componentes da parede celular vegetal.....	19
Figura 3. Efeito do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica.	21
Figura 4. Mecanismo de ação do complexo enzimático sobre a molécula de celulose.....	25
Figura 5. Farelo de trigo (a) e sabugo de milho (b).....	28
Figura 6. <i>Penicillium</i> sp. FSDE15.....	29
Figura 7. Distribuição granulométrica dos resíduos de farelo de trigo e sabugo de milho.	41
Figura 8. Comparação entre os valores de umidade (a) e pH (b) para os diferentes cultivos.	43
Figura 9. Produção de CMCase (a), FPase (b) e β -glicosidase (c), por <i>Penicillium</i> sp. FSDE15 para ensaios realizados com farelo de trigo e sabugo de milho fontes de carbono. Os dados estão representados pelas médias \pm desvios-padrão.	44
Figura 10. Crescimento do <i>Penicillium</i> sp. FSDE15 nos tempos de 0, 72, 144 e 240 h para os cultivos com farelo de trigo puro (a), sabugo de milho puro (b) e sabugo + farelo (c).....	48
Figura 11. Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis tempo, temperatura e concentração de H_2SO_4 no teor de AR.	52
Figura 12. Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis tempo, temperatura e concentração de H_2SO_4 no teor de LS.....	53
Figura 13. Superfície de resposta para o teor de AR em função do tempo e temperatura no pré-tratamento ácido.	54
Figura 14. Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis tempo, temperatura e concentração de NaOH no teor de AR.	58
Figura 15. Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis tempo, temperatura e concentração de NaOH no teor de LS.	58
Figura 16. Superfícies de resposta para o teor de LS em função do tempo e temperatura (a), do tempo e da concentração (b) e da temperatura e da concentração (c) no pré-tratamento alcalino.	59
Figura 17. Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis tempo e temperatura no teor de AR.....	62
Figura 18. Superfície de resposta para o teor de AR em função do tempo e temperatura no pré-tratamento hidrotérmico.	63

Figura 19. Sabugo de milho (a), pré-tratado com H ₂ SO ₄ (b), pré-tratado com NaOH (c) e pré-tratado hidrotermicamente (d).	64
Figura 20. Teores de AR, g/L e produtividade (g/L.h) para as hidrólises enzimáticas realizadas com sabugo de milho pré-tratado com H ₂ SO ₄ (a), sabugo de milho pré-tratado com NaOH (b) e sabugo de milho pré-tratado hidrotermicamente (c). Os dados estão representados pelas médias ± desvios-padrão. E.E.: extrato enzimático de <i>Penicillium</i> sp. FSDE15; C.C.: enzima Celluclast.	68
Figura 21. Percentual de conversão de celulose e hemicelulose em glicose para as hidrólises realizados com sabugo pré-tratado com H ₂ SO ₄ (a), sabugo pré-tratado com NaOH (b) e sabugo pré-tratado hidrotermicamente (c).	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Evolução da produção mundial de milho, em mil toneladas.....	16
Tabela 2. Composição química de alguns materiais lignocelulósicos.....	20
Tabela 3. Fatores e seus níveis correspondentes para os planejamentos experimentais dos pré-tratamentos químicos.....	36
Tabela 4. Parâmetros da caracterização físico-química do farelo de trigo e sabugo de milho.....	40
Tabela 5. Comparação da composição química do sabugo de milho in natura.....	49
Tabela 6. Resultados do planejamento experimental 2^3 para o pré-tratamento com H_2SO_4	50
Tabela 7. Análise de variância para a resposta AR no pré-tratamento ácido.....	51
Tabela 8. Análise de variância para a resposta LS no pré-tratamento ácido.....	51
Tabela 9. Resultados do planejamento experimental 2^3 para o pré-tratamento com NaOH.....	56
Tabela 10. Análise de variância para a resposta AR no pré-tratamento alcalino.....	56
Tabela 11. Análise de variância para a resposta LS no pré-tratamento alcalino.....	57
Tabela 12. Resultados do planejamento experimental 2^2 para o pré-tratamento hidrotérmico.....	61
Tabela 13. Análise de variância para a resposta AR no pré-tratamento hidrotérmico.....	61
Tabela 14. Análise de variância para a resposta LS no pré-tratamento hidrotérmico.....	61
Tabela 15. Comparação da composição química dos sabugos in natura e pré-tratados.....	65
Tabela 16. Porcentagem de remoção dos componentes celulose, hemicelulose e lignina para os diferentes pré-tratamentos.....	66
Tabela 17. Balanço de massa utilizando os três tipos de sabugo pré-tratado para 1 tonelada de biomassa inicial.....	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. OBJETIVO GERAL	14
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. Milho.....	16
2.2. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de Etanol 2G	18
2.3. Pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos.....	20
2.4. Enzimas celulolíticas	24
2.5. Produção de enzimas por fermentação sólida.....	26
2.6. Hidrólise enzimática	26
3. METODOLOGIA.....	28
3.1. Avaliação da produção de celulases usando sabugo de milho.....	28
3.1.1. Preparo dos substratos	28
3.1.2. Caracterização físico-química	28
3.1.3. Microrganismo	29
3.1.4. Preparo do inóculo.....	29
3.1.5. Cultivo	30
3.1.6. Atividade enzimática	31
3.2. Obtenção e concentração do extrato enzimático bruto	34
3.3. Pré-tratamento do sabugo de milho	34
3.3.1. Caracterização lignocelulósica do sabugo de milho.....	34
3.3.2. Planejamento experimental.....	35
3.4. Hidrólise enzimática	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Avaliação da produção de celulases usando sabugo de milho.....	40
4.1.1. Caracterização físico-química dos substratos.....	40
4.1.2. Ensaio fermentativos.....	42
4.2. Avaliação dos pré-tratamentos do sabugo de milho	49

4.2.1.	Caracterização lignocelulósica do sabugo.....	49
4.2.2.	Pré-tratamento do sabugo de milho.....	50
4.2.3.	Caracterização lignocelulósica do sabugo pré-tratado.....	64
4.3.	Hidrólise enzimática do sabugo de milho.....	67
4.4.	Aumento de escala para a produção de bioetanol.....	72
5.	CONCLUSÕES.....	74
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1. INTRODUÇÃO

O milho é um dos grãos de maior destaque no Brasil e o país está entre os cinco maiores produtores mundiais, sendo sua produção uma das atividades agrícolas mais frequentes nas propriedades rurais. Além de ser fonte de renda para os agricultores, os resíduos gerados podem ser utilizados como complemento para ração animal, embora estes sejam pobres em nutrientes essenciais (CRUZ et al., 2011; SANTOS, 2014). A produção no Brasil se manteve estável nos últimos anos, atingindo um patamar de, aproximadamente, 102,5 milhões de toneladas na safra de 2019/2020, sendo que cerca de 88% dessa produção se concentrou na região Centro-Sul brasileira (CONAB, 2021).

A maior parte do milho que é cultivado no país é utilizada para alimentação animal e a geração de resíduo deste cereal pode ser dividida em sabugo, folha, caule e palha. As folhas e os caules são deixados no campo para ciclagem de nutrientes. Outra parte é utilizada em fornalhas para a geração de calor. Uma lavoura de milho pode gerar entre 6 e 12 toneladas por hectare de resíduos vegetais, sendo que, quando produzido em grandes quantidades, o milho gera um grande problema devido ao descarte realizado de maneira inadequada. Esses resíduos são abundantes em carbono e nitrogênio, podendo ser utilizados como substratos para a produção de produtos de valor agregado, como enzimas e biocombustíveis (KONZEN; ALVARENGA, 2008; DANTAS, 2013; TRAKARNPAIBOON et al., 2017; VIEIRA JÚNIOR et al., 2020).

As enzimas podem ser produzidas por microrganismos, dentre eles os fungos filamentosos. Entre elas, destaca-se a celulase, enzima capaz de hidrolisar a celulose e liberar glicose, que pode ser fermentada a etanol por ação de leveduras. As celulasas são amplamente utilizadas na indústria têxtil, modificando as propriedades físicas dos tecidos; detergentes, aumentando o teor de remoção de sujeira; fabricação de papel; processamento de alimentos e bebidas, atuando nas etapas de extração e clareamento de sucos, néctares, vinhos, cervejas e purês; ração animal, entre outras áreas (STROPARO, 2012; FERREIRA et al., 2014; PEREIRA et al., 2015).

O etanol celulósico, etanol de segunda geração ou bioetanol, é produzido a partir da hidrólise de açúcares provenientes de diferentes biomassas lignocelulósicas, como cana-de-açúcar e milho, que acabam por não competir com o etanol de primeira geração, produzido a partir de fontes alimentares. No Brasil, a produção de etanol celulósico é realizada a partir dos resíduos da palha e do bagaço de cana (GONÇALVES; SANTOS; MACÊDO, 2015; LI et al., 2016).

O interesse pelo uso de fontes alternativas de energia, que utilizam matérias-primas sustentáveis para a sua produção, foi desencadeado, principalmente, devido ao possível esgotamento de combustíveis fósseis derivados do petróleo, aliado ao aumento expressivo do lançamento de gases causadores do efeito estufa e, também, a uma crescente conscientização acerca das mudanças climáticas em todo o mundo (SCULLY; ORLYGSSON, 2015; PELLERA; GIDARAKOS, 2016).

No entanto, algumas das principais dificuldades da produção de bioetanol são o alto custo das enzimas celulases (até 40% do custo de produção), baixa produtividade e rendimento e a dificuldade de escalonamento da etapa de hidrólise. Esse impacto pode ser melhor percebido ao comparar os números anuais das duas únicas empresas do país que se dedicam à pesquisa e produção de bioetanol com as respectivas capacidades de suas plantas industriais. Juntas, Raízen e GranBio produziram mais de 6,11 milhões de litros em 2019 e processaram cerca de 81.000 toneladas de bagaço e palha de cana, mas têm capacidade de produção de 82 e 40 milhões de litros, respectivamente, por ano (BELLETATO, 2019; LORENZI; ANDRADE, 2019).

No trabalho de Carvalho-Gonçalves (2017), a autora mostrou que é possível produzir celulases usando o fungo *Penicillium* sp. FSDE15 e farelo de trigo como substrato; no presente trabalho, pretendeu-se avaliar a produção de celulases usando o sabugo de milho, na composição do substrato. A produção de coquetéis enzimáticos com alta atividade, e de baixo custo, tem sido um dos pontos-chave para uma produção de etanol de segunda geração economicamente viável. Arelado a isso, os processos de pré-tratamento, eficazes na redução da recalcitrância da biomassa, são fundamentais para uma hidrólise enzimática efetiva e fermentação alcoólica dos açúcares liberados.

1.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de enzimas celulases por meio do fungo *Penicillium* sp. FSDE15 usando sabugo de milho como substrato. Avaliar os pré-tratamentos ácido, básico e hidrotérmico do sabugo e realizar a hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado usando a enzima produzida.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização físico-química do sabugo de milho e do farelo de trigo;
- Produzir enzimas celulases pelo fungo *Penicillium* sp. FSDE15, por meio da fermentação em estado sólido, utilizando farelo trigo e sabugo de milho como substratos;
- Promover os pré-tratamentos ácido, básico e hidrotérmico do sabugo de milho, avaliando as melhores condições de tempo, temperatura e concentração de reagente, por meio de um planejamento experimental;
- Realizar a caracterização lignocelulósica do sabugo de milho com e sem pré-tratamento, a fim de comparar os teores de celulose, hemicelulose e lignina;
- Avaliar a hidrólise enzimática do sabugo de milho com e sem pré-tratamento utilizando extrato enzimático produzido por *Penicillium* sp. FSDE15 e celulase comercial Celluclast®.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Milho (*Zea mays* L.)

O Brasil se destaca por ser um dos maiores produtores e exportadores mundiais de milho. Em 2020, a área total plantada no país foi de 18.527.300 hectares, com apenas 18,53% dessa área correspondendo à região Norte-Nordeste, enquanto a produtividade para este mesmo ano foi de 5537 kg/ha. A safra de 2020/2021 no Brasil deve atingir cerca de 109 milhões de toneladas de milho, de acordo com o boletim de grãos do mês referente ao mês de abril de 2021 (CONAB, 2021).

Na produção do grão a nível mundial, os Estados Unidos ocupam a primeira posição, seguido da China e do Brasil. Analisando a Tabela 1, percebe-se um aumento gradual da produção de milho pelo Brasil e, comparando-se as safras 2007/08 e 2018/19, o aumento foi de, aproximadamente, 66%. No quesito exportação, o país ocupou a segunda posição, ultrapassando a Argentina – que, por muitos anos ocupou essa posição – e ficando atrás apenas dos Estados Unidos (CONAB, 2019).

Tabela 1. Evolução da produção mundial de milho, em mil toneladas.

País	2007/08	2008/09	2010/11	2012/13	2014/15	2016/17	2018/19
EUA	331.177	305.911	315.618	273.192	361.091	384.778	366.287
China	152.300	165.914	177.245	205.614	215.646	219.554	257.330
Brasil	58.652	51.004	57.407	81.506	84.672	97.817	97.010
Mundo	795.739	800.249	836.304	874.290	1.023.180	1.075.333	1.120.465

Fontes: CONAB, 2018; CONAB, 2019.

Na classificação botânica, o milho pertence à família *Gramineae/Poaceae*, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. A semente do milho apresenta três partes: o pericarpo, o endosperma e o embrião. O pericarpo é uma camada fina e resistente, constituindo a parte mais externa da semente; o endosperma é a parte que apresenta maior volume, sendo constituída por amido e outros carboidratos; o embrião nada mais é do que a própria planta em miniatura. O milho pode atingir uma altura de cerca de 2 metros (Figura 1), podendo o seu porte variar em função das condições

climáticas, do fornecimento adequado de água, das características do solo e da fertilidade do mesmo (MAGALHÃES et al., 2002; BARROS; CALADO, 2014).

Figura 1. Planta do milho.



Fonte: Barros; Calado, 2014.

A cultura do milho encontra-se amplamente disseminada no Brasil. Isto se deve tanto à sua multiplicidade de usos na propriedade rural quanto à tradição de cultivo desse cereal pelos agricultores brasileiros (MAGALHÃES et al., 2002).

O milho dá origem a uma série de produtos industrializados. Entretanto, o sabugo, que é a parte central da espiga, é considerado resíduo após o milho ser debulhado. Estima-se que, para cada 100 kg de espigas de milho, aproximadamente 18 kg são formados pelo sabugo. A palha também é considerada um resíduo, uma vez que é gerada em excedente e não tem utilização definida, sendo, na maioria das vezes, deixada no campo após a colheita ou, por vezes, queimada. O destino principal de ambos os resíduos é a ração animal (VIEIRA et al., 2012). Porém, estes resíduos também podem ser utilizados para produção de outros produtos em uma biorrefinaria, como enzimas celulolíticas e etanol de segunda geração (etanol 2G).

O elevado teor de polissacarídeos dos resíduos agroindustriais como palha de milho (EUA), de arroz (Ásia) e de trigo (Europa) e o bagaço de cana-de-açúcar (América do Sul), juntamente com sua abundância em todo o mundo, fazem com que essas biomassas sejam consideradas grandes promissoras na produção de etanol de segunda geração (PANDIYAN, 2019).

2.2. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de Etanol 2G

A preocupação existente com a demanda por combustíveis fósseis vem estimulando países a buscarem tecnologias alternativas e fontes sustentáveis de energia (biocombustíveis e energia renovável), materiais e produtos químicos. Além disso, as matérias-primas utilizadas para a obtenção desses combustíveis não são de fácil acesso nem economicamente viáveis, e seu processamento acarreta grandes problemas ambientais (MORAIS; MATA; BOGEL-LUKASIK, 2014; GARCIA et al., 2015).

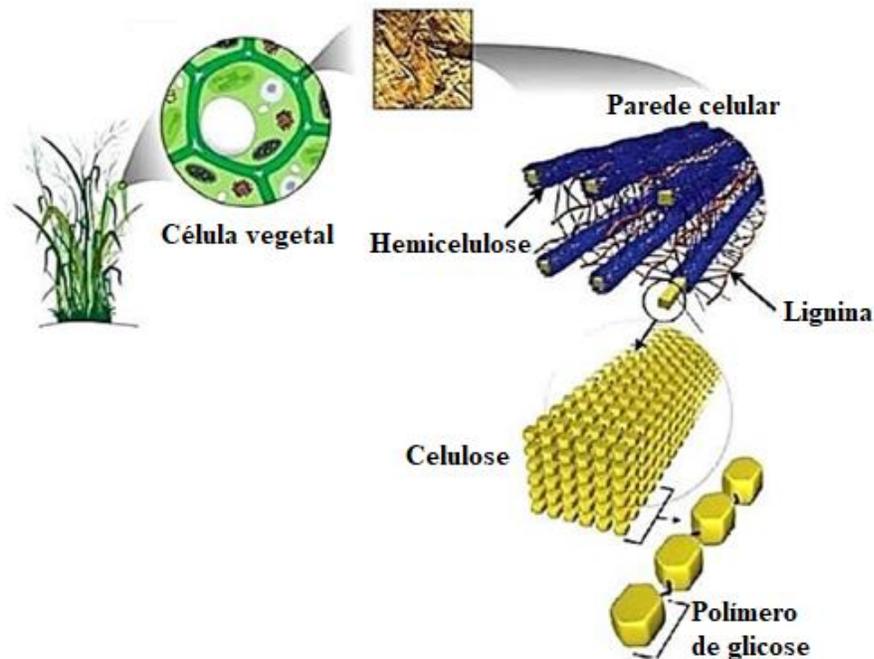
Entre as várias fontes sustentáveis de energia, pode-se citar o etanol. No Brasil, a cana-de-açúcar ainda é a principal matéria-prima para a produção desse combustível (SILVA, 2009). Entretanto, essa e outras atividades da agroindústria geram grandes quantidades de resíduos, ricos em biomassa lignocelulósica, que possuem alto potencial disponível para produção de energia, como o etanol de segunda geração.

A produção de bioetanol a partir de resíduos agroindustriais tem sido amplamente estudada, a fim de encontrar alternativas para a produção de biocombustíveis de fontes que não venham a competir com os alimentos. As principais vantagens do uso de resíduos agroindustriais na produção de etanol celulósico são a consequente diminuição do seu desperdício no meio ambiente, a sua abundância, a redução do impacto ambiental gerado pelos combustíveis fósseis e o seu baixo custo de aquisição (MELZER et al., 2013; DUQUE; CARDONA; MONCADA, 2015).

Entre os diversos resíduos utilizados para produção de insumos de alto valor agregado, tem-se a farinha de babaçu (CINELLI et al., 2014), bagaço de cana-de-açúcar (PANDEY et al., 2000), sabugo de milho (GUIMARÃES et al., 2013), pseudocaule de bananeira (ASGHER; KHAN; BILAL, 2016), abacaxi (ALGAR et al., 2014), fibra de coco verde (BISPO et al., 2016), farelo de arroz (SOAM et al., 2016), entre outros.

A composição química da fibra vegetal dos resíduos agroindustriais é bem diversa e possui uma característica atraente para obter produtos de valor agregado que entram no conceito de biorrefinaria. Em particular, é na parede celular das células das fibras que se encontram os compostos desejados: a celulose, a hemicelulose e a lignina. Os dois primeiros compostos são os mais importantes pois são utilizados como substratos para a obtenção de açúcares para posterior fermentação alcoólica (SOUSA, 2014; DUQUE; CARDONA; MONCADA, 2015). A Figura 2 mostra a estrutura típica da parede celular das fibras vegetais.

Figura 2. Estrutura dos componentes da parede celular vegetal.



Fonte: adaptado de ASSIS, 2015.

A celulose é o polímero mais abundante da parede vegetal e é definido como um homopolissacarídeo composto por moléculas de D-glicose unidas entre si por ligações β -1,4 glicosídicas. Duas moléculas de glicose são unidas formando a celobiose, por meio da eliminação de uma molécula de água entre seus grupos hidroxilas dos carbonos 1 e 4. A porcentagem de celulose na fibra vegetal corresponde a, aproximadamente, 40%, podendo esse valor variar drasticamente (CARVALHO, 2011; AYALA, 2012; OGATA, 2013; SOUSA, 2014).

Dois propriedades são extremamente importantes para a classificação das celuloses: o índice de cristalinidade e o grau de polimerização. As celuloses possuem regiões cristalinas que são formadas por arranjos de cadeias de moléculas de D-glicose unidas por ligações de hidrogênio ao longo do seu comprimento. A presença dessas ligações é que origina essas regiões cristalinas, que acabam por dificultar a digestibilidade da celulose e aumentam a resistência da mesma à ação de enzimas específicas. O grau de polimerização, por sua vez, está relacionado com o número de unidades de glicose na cadeia de uma molécula de celulose. Quanto maior for esse número, maior será o grau de polimerização e, conseqüentemente, mais resistente será a estrutura formada, dificultando a ação das enzimas (OGATA, 2013; SHIMIZU, 2018).

As hemiceluloses compõem de 15 a 45% da biomassa lignocelulósica e consistem de cadeias amorfas, ramificadas de açúcares, como xilose, arabinose, glicose, manose, galactose e outros compostos. Elas possuem peso molecular variando entre 25 e 35.000 g/mol e contém ainda, ácidos hexurônicos e deoxiexoses. A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribuem para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (MARABEZI, 2009; MILÉO, 2011; FERREIRA, 2015).

A lignina é o componente responsável por fornecer rigidez à parede celular da planta e também é formada por cadeias amorfas e complexas, que fornecem às plantas suporte mecânico, resistência a patógenos e auxilia no transporte de água ao longo do vegetal (LI; PU; RAGAUSKAS, 2016). Proporções de celulose, hemicelulose e lignina são mostradas na Tabela 2 para diferentes biomassas lignocelulósicas.

Tabela 2. Composição química de alguns materiais lignocelulósicos.

Material lignocelulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3
Folhas de milho	37,6	34,5	12,6
Pseudocaule de bananeira	44,93	17,01	4,70
Casca de abacaxi	6,04	5,89	0,37
Bagaço de cana	40,2	26,4	25,2
Palha de cana	44,4	30,7	19,8
Palha de arroz	43,5	22,0	17,2
Palha de trigo	33,8	31,8	20,1

Fonte: SILVA, 2010; SANTOS et al., 2014; DUQUE; CARDONA; MONCADA, 2015.

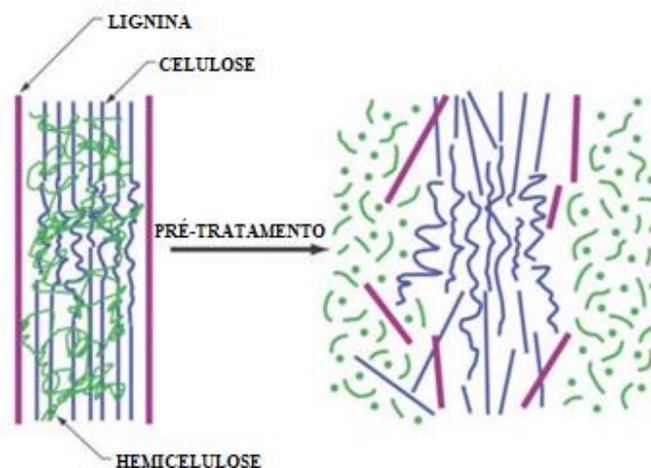
2.3. Pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos

A etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é essencial para a posterior hidrólise da celulose e fermentação dos açúcares a etanol de segunda geração. É considerada uma das etapas mais caras de todo o processo. Essa etapa é necessária para diminuir a recalcitrância do material, remover a barreira criada pela lignina (Figura 3), minimizar a formação de compostos inibidores e aumentar o tamanho dos poros e a área superficial da biomassa, além de diminuir o

grau de polimerização e o índice de cristalinidade da celulose (SOUSA, 2014; BHUTTO et al., 2017; ZHAO et al., 2017).

Para que o pré-tratamento seja considerado viável em larga escala, ele deve: degradar os componentes de interesse minimamente, ter um bom custo-benefício (em termos de capital gasto e custos operacionais) e ser aplicável para vários tipos diferentes de biomassas lignocelulósicas (KURIAN et al., 2013).

Figura 3. Efeito do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica.



Fonte: adaptado de SANTOS et al., 2012.

A escolha adequada do pré-tratamento irá depender das características intrínsecas à biomassa lignocelulósica e do processo na qual ela será utilizada. O pré-tratamento pode ser classificado como físico, químico, biológico ou combinado, no intuito de reduzir a recalcitrância da biomassa lignocelulósica (SAAD, 2010; BHUTTO et al., 2017).

Os pré-tratamentos físicos incluem diferentes tipos de irradiação, ultrassom e ações mecânicas, essas últimas sendo vastamente utilizadas em resíduos florestais. No pré-tratamento mecânico, vários tipos de moinhos são utilizados para reduzir a cristalinidade do material, como: moinhos de bolas, centrífugos, de martelo, de facas, vibratórios e outros (AMIN et al., 2017). Já o pré-tratamento hidrotérmico utiliza apenas água pura como solvente e a omissão de reagentes químicos fortes (ácidos e bases) reduz a corrosão de equipamentos, evita a necessidade de reciclagem de solvente e aumenta o custo-benefício, uma vez que é um processo com baixos custos operacionais e é ecológico (NITSOS; MATIS; TRIANTAFYLLIDIS, 2013; TRAJANO et al., 2013).

Os pré-tratamentos biológicos são aqueles no qual a biomassa lignocelulósica é submetida à ação de microrganismos ou enzimas. Esse tipo de pré-tratamento possui algumas vantagens quando comparado aos outros tipos, como a não utilização de produtos químicos e a consequente não liberação de compostos tóxicos para o meio ambiente, além de ser visto como uma alternativa viável e ecológica (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

Esse tipo de pré-tratamento ocorre quando os microrganismos secretam diferentes enzimas capazes de decompor a biomassa lignocelulósica, formando açúcares com 5 e 6 carbonos. Um exemplo de microrganismo capaz de hidrolisar diferentes biomassas é o chamado fungo de podridão branca (*white-rot fungus*), pertencente à classe dos basidiomicetos. Ele produz enzimas ligninolíticas, principalmente a lignina peroxidase, que são responsáveis pela diminuição do teor de lignina no material lignocelulósico (SAHA et al., 2016; SHARMA; XU; QIN, 2019).

Diversos microrganismos, em especial os fungos, vem sendo testados a fim de pré-tratar material lignocelulósico. Suhara et al. (2012) utilizaram fungo do gênero *Punctularia* para o pré-tratamento do bambu e obtiveram uma degradação de mais de 50% de lignina. Du et al. (2011) pré-trataram resíduos da plantação de milho com *Irpex lacteus* e obtiveram um rendimento de 82% na etapa de hidrólise em 28 dias. Cianchetta et al. (2014), por sua vez, obtiveram resultados expressivos para o pré-tratamento da palha de trigo usando o fungo da espécie *Ceriporiopsis subvermispora*.

Dentre os pré-tratamentos químicos, destacam-se os ácidos (diluídos ou concentrados) e os alcalinos. É importante frisar que, ao utilizar condições severas de temperatura e concentração de reagente, pode-se favorecer a geração de compostos inibidores de crescimento, dentre eles os ácidos carboxílicos, sais inorgânicos e compostos fenólicos (JUNG et al., 2013).

O pré-tratamento químico com soluções diluídas de ácido, entre eles o sulfúrico (H_2SO_4), o fosfórico (H_3PO_4), o nítrico (HNO_3) e o clorídrico (HCl), promove a hidrólise quase completa da hemicelulose em monossacarídeos acessíveis a microrganismos para a produção de bioetanol. Esse tipo de pré-tratamento também resulta na recuperação dos monossacarídeos na fração líquida gerada e no aumento do teor de celulose na fração sólida (DAGNINO et al., 2013; LOOW et al., 2016; LI et al., 2017).

Vários estudos vêm sendo realizados utilizando soluções diluídas de ácidos. Timung et al. (2015) pré-trataram o bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 a uma concentração de 0,5% e obtiveram valores de açúcares redutores totais (ART) consideráveis. Uppugundla et al. (2014) obtiveram ótimos resultados utilizando o mesmo ácido a 0,5% para pré-tratar resíduos da plantação

de milho. A hidrólise ácida diluída também tem sido comumente utilizada em tratamentos combinados com outras tecnologias, como explosão a vapor, irradiação por micro-ondas e amônia aquosa (LOOW et al., 2016).

O pré-tratamento ácido concentrado utiliza concentrações altas de ácidos, sendo o mais utilizado, o ácido sulfúrico. A vantagem de se utilizar altas concentrações é a não-necessidade de altas pressões e temperaturas no processo, que acaba por minimizar a degradação dos açúcares. Entretanto, o uso de altas concentrações de ácido faz com que sejam necessárias grandes quantidades de água ou solvente alcalino para a neutralização do material (SOUSA, 2014). Além disso, há uma maior formação de compostos inibidores, como o furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético e ácido fórmico (DAGNINO et al., 2013).

O pré-tratamento alcalino, por sua vez, utiliza bases como o hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), carbonato de sódio (Na₂CO₃) e amônia (NH₃) a fim de solubilizar a lignina presente na biomassa lignocelulósica. Concentrações de 6 a 8% de NaOH, aliadas com temperaturas relativamente altas, são capazes de dissolver grande parte da lignina e expor a celulose ao ataque enzimático. Uma vantagem desse tipo de pré-tratamento é a possibilidade de recuperação e reutilização do reagente e o uso de condições mais brandas de temperatura quando comparado ao uso de reagentes ácidos, evitando, assim, a preocupação com possíveis corrosões em equipamentos (SALEHIAN et al., 2013; KIM; LEE; KIM, 2016).

Vários trabalhos têm sido realizados utilizando o hidróxido de sódio como reagente alcalino para pré-tratar as mais diversas biomassas lignocelulósicas, como madeira de árvores do gênero *Populus* (MENG et al., 2015), madeira de pinheiro (SALEHIAN et al., 2013) e bagaço de sorgo (UMAGILYAGE et al., 2015).

Rahnama e outros (2013) pré-trataram a palha de arroz com NaOH a 0,5% por 121 °C por 20 min e obtiveram uma solubilização de lignina de, aproximadamente, 36% e um aumento no teor de celulose de 50%. Bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado por Zhu et al. (2016) utilizando NaOH a 0,8% e temperatura de 120 °C, onde foi possível remover cerca de 49% da lignina.

Também é possível realizar pré-tratamentos químicos combinados. Lee et al. (2015) realizaram um pré-tratamento ácido seguido de um alcalino, a fim de pré-tratar resíduos da plantação de milho. As concentrações de H₂SO₄ variaram num intervalo de 0,25 a 1% e as temperaturas de 140 a 180 °C; o pré-tratamento alcalino, com NaOH, foi realizado a 2% de concentração e 80 °C. Essa combinação foi responsável por hidrolisar mais de 74% da xilana e 85% da lignina presente nesses resíduos.

2.4. Enzimas celulolíticas

A demanda do uso de técnicas sustentáveis fez com que o uso da tecnologia enzimática aumentasse expressivamente. As enzimas são capazes de gerar acelerações nas taxas de reação, são eficientes catalisadoras, promovem condições brandas de reação e são biodegradáveis (DICOSIMO et al., 2013; MOHAMAD et al., 2015).

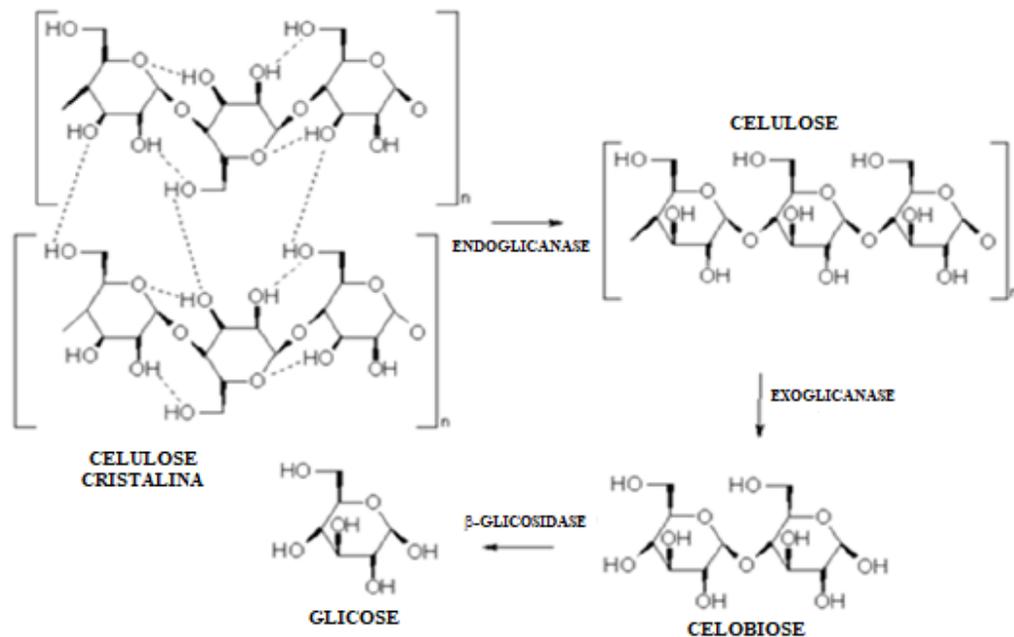
As enzimas celulolíticas, ou celulases, são enzimas capazes de hidrolisar a celulose presente em materiais lignocelulósicos e liberar açúcares para a produção de biocombustíveis (ALSHEIKH-HUSSAIN; ALTENAIJI; YOUSEF, 2014).

As celulases comerciais (escala industrial) são produzidas, principalmente, pelas espécies de fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* por meio da fermentação submersa. Entretanto, esse tipo de fermentação necessita de controles rígidos de parâmetros como pH, agitação, temperatura e níveis de oxigênio e nitrogênio, o que acaba por aumentar significativamente os custos finais de produção e, conseqüentemente, o preço final do produto. Além disso, os rendimentos obtidos costumam ser baixos e o gasto energético é alto (SINGHANIA; SUKUMARAN; PANDEY, 2007; CERDA et al., 2017; SINGHANIA et al., 2017).

Por este motivo, a fermentação em estado sólido vem sendo amplamente utilizada para a produção de celulases em escala laboratorial. Esse tipo de fermentação é mais barato e o produto final possui alta concentração enzimática (SRIVASTAVA et al., 2015).

A ação combinada de múltiplas enzimas com especificidades diferentes a cada substrato é necessária de forma a hidrolisar completamente a celulose. As enzimas celulases secretadas por fungos filamentosos são formadas por três componentes que atuam em conjunto para liberar glicose que poderá ser fermentada a etanol celulósico posteriormente: endoglicanases (celodextrinases), exoglicanases (celobiohidrolases) e β -glicosidases (celobiasas). O mecanismo de ação desses componentes pode ser observado na Figura 4.

Figura 4. Mecanismo de ação do complexo enzimático sobre a molécula de celulose.



Fonte: adaptado de MORETTI, 2013.

As endoglicanases (também chamadas de celulases não-processuais) são responsáveis por iniciar a hidrólise, clivando as ligações glicosídicas nas regiões amorfas da fibra celulósica e gerando oligossacarídeos de cadeia longa com diversos graus de polimerização, estes ficando disponíveis ao ataque das exoglicanases. As exoglicanases (ou celulases processuais), por sua vez, se ligam às extremidades das cadeias de celulose e clivam os oligômeros de cadeia longa gerados pela ação das endoglicanases, liberando unidades dissacarídicas conhecidas como celobiose. A celobiose, juntamente com outros oligossacarídeos curtos são, então, hidrolisados em monômeros de glicose por meio da ação das β -glicosidasases (SALES et al., 2010; MORETTI, 2013; JUTURU; WU, 2014; PAYNE et al., 2015).

Na natureza, há uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases, destacando-se algumas bactérias e fungos filamentosos. Estes últimos possuem a vantagem de liberarem as enzimas diretamente no meio em que se encontram e são fáceis de serem cultivados (GUIMARÃES et al., 2006). Entre as bactérias produtoras de celulase têm-se a *Anaerocellum thermophilum* (ZHANG; ZHANG, 2013), *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Serratia marscens* (SETHI et al., 2013) e bactérias do gênero *Streptomyces*, *Bacillus* e *Anoxybacillus* (SADHU; MAITI, 2013). Os fungos filamentosos que mais se destacam na produção de enzimas

são: *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* (YOON et al., 2014), e gêneros como *Humicola*, *Fusarium*, *Rhizopus* e *Thermomyces* (SRIVASTAVA et al., 2018).

2.5. Produção de enzimas por fermentação sólida

As enzimas secretadas por fungos filamentosos podem ser produzidas por meio de duas maneiras: fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS). A principal diferença entre essas duas fermentações é a quantidade de água presente juntamente com o substrato. Na FS, os microrganismos crescem em um meio líquido, enquanto que na FES, não há água livre presente no meio (SOCCOL et al., 2017).

A FES oferece vantagens quando comparada à FS, entre elas: maior rendimento, produtividade e distribuição de oxigênio no meio, menor gasto de energia, não-necessidade de agitação, melhor adaptação ao fungo (pois o meio simula o habitat do microrganismo), meio de fermentação mais barato, além da menor geração de efluentes (HANSEN et al., 2015; KAPILAN, 2015; RAMOS-SÁNCHEZ et al., 2015).

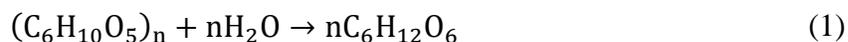
A fermentação em estado sólido vem sendo amplamente utilizada para a produção das mais diversas enzimas, como as amilases (ALIYAH et al., 2017), esterases (FERRER-PARRA et al., 2018), L-asparaginases (DORIYA et al., 2016), lipases (COLLA et al., 2015), lacases (KUHAR; CASTIGLIA; LEVIN, 2015), pectinases (ORTIZ et al., 2016), proteases (NOVELLI; BARROS; FLEURI, 2015), entre outras.

2.6. Hidrólise enzimática

Para a produção de etanol de segunda geração, o material lignocelulósico deve ser, primeiramente, convertido em açúcares fermentáveis. Isso pode ser realizado por meio de duas etapas, um pré-tratamento seguido de hidrólise enzimática (LANCEFIELD et al., 2016). Essa hidrólise pode ser influenciada tanto pela enzima como também pela biomassa lignocelulósica. A enzima pode sofrer inibição da formação do produto de interesse, enquanto o substrato possui características físicas, químicas e morfológicas próprias que podem acabar por influenciar o produto final (MODENBACH; NOKES, 2013; SUN et al., 2016).

Após a etapa de hidrólise enzimática, os açúcares liberados são posteriormente fermentados a etanol (CYPRIANO, 2015). A reação de hidrólise é aquela na qual ocorre a quebra

de uma ligação química com inserção de água a fim de converter os carboidratos em monômeros, conforme a Equação 1:



O etanol de segunda geração pode ser obtido por meio da fermentação e hidrólise separadas (FHS) e da fermentação e hidrólise simultâneas (FHSm). Na FHS, o etanol é obtido em duas etapas, sendo a hidrólise da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis a primeira delas, seguida da fermentação, geralmente utilizando leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Já na FHSm, ambas as etapas são realizadas de maneira integrada, de modo que o processo seja mais simples e o gasto de energia seja consideravelmente menor quando comparada à FHS. Além disso, na FHSm, é possível obter um maior índice de sacarificação enzimática e um rendimento final de etanol. Entretanto, uma desvantagem desse processo é a necessidade de se trabalhar com uma temperatura que seja compatível com a etapa de fermentação (abaixo de 40 °C) o que acaba por comprometer a etapa de hidrólise, que é eficiente em temperaturas mais altas (HASUNUMA; KONDO, 2012; RODRIGUES et al., 2016; TRAKARNPAIBOON et al., 2017).

A cinética da hidrólise enzimática geralmente ocorre de tal maneira que a taxa de reação é alta no começo e tende a cair com o tempo. O tipo de substrato e suas características intrínsecas, como índice de cristalinidade e grau de polimerização da celulose, podem vir a modificar o comportamento dessa cinética. Além disso, as propriedades do coquetel enzimático (comercial ou não) podem diminuir o rendimento de açúcares fermentáveis, pois pode haver inibição da formação do produto final, desativação das enzimas devido à mudanças de temperatura, competição entre as diferentes enzimas que compõem o coquetel, entre outros fatores (YU et al., 2012; PECIULYTE et al., 2015).

Rodrigues et al. (2016), realizaram tanto FHS como FHSm usando a espécie fúngica *Kluyveromyces marxianus* e o bagaço de caju pré-tratado com H₂SO₄ a 5,88% e NaOH 4%. Para a FHS, os autores obtiveram uma concentração máxima e um rendimento de etanol de 24,13 g/L e 0,39 g/g de glicose, respectivamente, nas condições de 30 °C e 150 rpm. A FHSm, por sua vez, atingiu um pico de 25,56 g/L de concentração de etanol e um rendimento de 0,31 g/g de glicose, a 40 °C. Os valores encontrados foram similares, provando que ambos os processos (FHS e FHSm) são viáveis e podem ser usados para a produção de etanol de segunda geração.

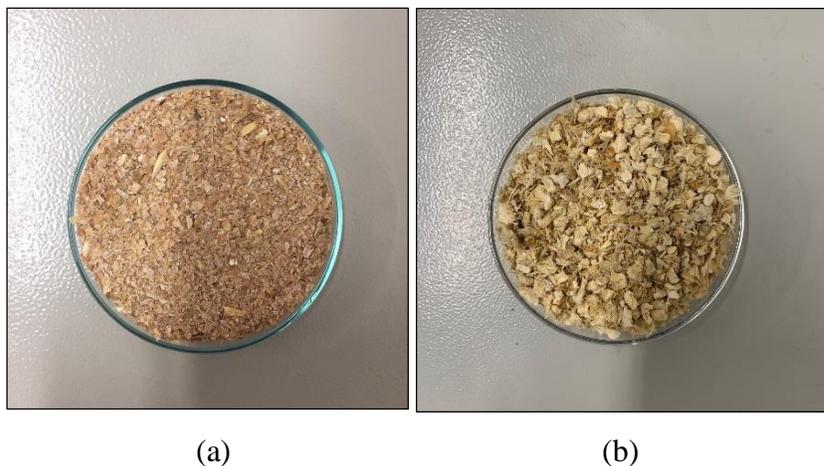
3. METODOLOGIA

3.1. Avaliação da produção de celulases usando sabugo de milho

3.1.1. Preparo dos substratos

Para os diferentes tipos de cultivos realizados, a fim de se produzir as enzimas celulolíticas, foram utilizados dois substratos provenientes da agroindústria: farelo de trigo e sabugo de milho. O farelo de trigo foi obtido no comércio local da cidade de João Pessoa-PB, seco e na forma de pó, pronto para ser utilizado. Já o sabugo de milho foi adquirido através de comerciantes da cidade de Areia-PB, que necessitou ser triturado em máquina forrageira e seco em estufa a 60 °C por 72 h. Ambos foram armazenados em recipientes fechados e em temperatura ambiente. A Figura 5 mostra o aspecto do farelo de trigo e do sabugo de milho, respectivamente, prontos para utilização.

Figura 5. Farelo de trigo (a) e sabugo de milho (b).



3.1.2. Caracterização físico-química

A caracterização físico-química dos substratos quanto ao pH, teor de sólidos solúveis (°Brix), massa específica real e umidade foram realizadas de acordo com o Instituto Adolfo Lutz (2008). Massa específica aparente e granulometria foram realizados de acordo com Correia (2004). A análise de porosidade foi adaptada de Keey (1991) e a de açúcares redutores (AR) por

metodologia descrita por Miller (1959). A quantificação da proteína total foi realizada utilizando a metodologia de digestão de Kjeldahl (1883) juntamente com o método colorimétrico de Baethgen e Alley (1989). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.1.3. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o fungo *Penicillium* sp. FSDE15, isolado do solo de descanso do cultivo de cana-de-açúcar (CARVALHO-GONÇALVES, 2017). O microrganismo foi conservado sob refrigeração, em meio ágar-batata-dextrose (BDA) e pode ser visualizado na Figura 6.

Figura 6. *Penicillium* sp. FSDE15.



3.1.4. Preparo do inóculo

Foi feito o repique do fungo do estoque para placas de Petri contendo meio BDA em condições estéreis. As placas contendo o meio BDA foram inoculadas com o *Penicillium* sp. FSDE15 e incubadas em temperatura ambiente por sete dias, para o seu crescimento. Após o crescimento, foi feita a suspensão dos esporos, usando água destilada esterilizada, o suficiente para cobrir a placa. Os esporos foram suspensos com auxílio de alça de platina. A suspensão de esporos foi acondicionada em tubo esterilizado. A quantificação da suspensão assim obtida foi feita por meio da contagem dos esporos em câmara de Neubauer espelhada, com auxílio do microscópio.

O volume de suspensão de esporos adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a ter-se uma concentração de 10^6 esporos por g de substrato sólido. As Equações 2 e 3

(CARDOSO; SANTOS; SANTOS, 2019) utilizadas para o cálculo do volume de inóculo foram as seguintes:

$$CI = \sum * 5 * 10^4 * f \quad (2)$$

Onde: CI é concentração do inóculo (esporo/mL);

\sum é o número de esporos na câmara de Neubauer (quatro extremidades e o centro);

5 é multiplicação de forma a expandir para os 25 quadrantes totais da câmara;

10^4 é conversão de mm^3 para cm^3 , pois cada quadrante da câmara possui dimensões $1 \times 1 \times 0,1$ mm;

f = fator de diluição da amostra, se houver.

$$VI = (C * MS) / CI \quad (3)$$

Onde: VI é o volume de inóculo (mL);

C é a concentração de esporos e equivale a 10^6 (esporos/g);

MS é a massa de substrato (g).

3.1.5. Cultivo

Os ensaios foram realizados em triplicata e para um total de 100 g de massa de meio, com umidade de 60%, concentração de esporos de 10^6 esporos por g de substrato e temperatura de ambiente (30 °C). As seguintes proporções de substrato foram utilizadas:

- Ensaio 1: farelo de trigo puro (100%)
- Ensaio 2: sabugo de milho puro (100%)
- Ensaio 3: sabugo de milho (50%) e farelo de trigo (50%)

Preparou-se uma solução de sulfato de amônia 1% (m/m_{H2O}) (CARDOSO; SANTOS; SANTOS, 2019), que foi usada para umedecimento dos substratos e para atuar como fonte de nitrogênio. Para o preparo dessa solução, foi necessário calcular a quantidade de água para

umedecer os substratos. Esse cálculo foi feito de acordo com a umidade apresentada por cada substrato. A Equação 4 foi utilizada para o cálculo da quantidade de água.

$$MA = [MM * (UI - US)] / (1 - UI) \quad (4)$$

Onde: MA é a massa de água (g);

MS é a massa de substrato (g);

UI é a umidade ideal do substrato;

US é a umidade real do substrato.

Após o preparo da solução de sulfato de amônia 1% (m/m_{H2O}), os substratos foram umedecidos, agitados para uniformização e dispostos em frascos erlenmeyers de 1000 mL para esterilização em autoclave por 15 min e temperatura de 121 °C. Após o processo de esterilização, os frascos erlenmeyers com os meios de cultivo foram deixados em temperatura ambiente para resfriar. Em seguida, foi feita a inoculação com os esporos previamente suspensos. Foi necessário homogeneizá-los bem para um crescimento uniforme do fungo.

Os ensaios foram monitorados por um período de 240 h, o equivalente a 10 dias. A cada dia, inclusive no momento de inoculação, uma amostra de aproximadamente 3 g foi retirada de cada cultivo, a fim de serem analisados a umidade, o pH e as atividades enzimáticas. A umidade foi analisada de acordo com a metodologia de Correia (2004) e o pH foram analisados de acordo com o Instituto Adolfo Lutz (2008). O extrato enzimático foi obtido adicionando-se 15 mL de água destilada para cada 1 g de substrato (amostra). Após homogeneização e repouso de 30 min em temperatura ambiente, as amostras foram filtradas, usando papel de filtro qualitativo. O extrato enzimático foi estocado em microtubos e congelado (-20 °C) para posterior análise de atividade de CMC_{Case} (endoglicanase), FPase (celulase total) e β-glicosidase (celobiase).

3.1.6. Atividade enzimática

Para a análise da atividade enzimática, os extratos obtidos foram descongelados e centrifugados a 12000 rpm por 5 min, em temperatura ambiente. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.1.6.1. CMCase

A atividade CMCase foi determinada de acordo com a metodologia padrão descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987). O método se baseia na dosagem da concentração de AR liberados durante a degradação do substrato carboximetilcelulose (CMC).

O meio reacional foi formado por 0,25 mL de uma solução de CMC 4% (g/mL) em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e 0,25 mL do sobrenadante das culturas (extrato enzimático). A mistura reacional foi incubada a 50 °C, durante 10 min. A reação enzimática foi interrompida pela adição imediata de 0,5 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). O reagente DNS, além de interromper a reação enzimática, possibilita a realização da dosagem da concentração de AR produzidos pela ação enzimática, obtida após fervura por 5 min a 100 °C. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, após diluição com 6,5 mL de água destilada. O valor da atividade enzimática CMCase pode então, ser calculado através da Equação 5:

$$\text{CMCase (U/g)} = \frac{(A - B) * f * r * 0,5}{0,18 * 10 * 0,25} \quad (5)$$

Onde: A é a absorbância da amostra;

B é a absorbância do controle da amostra;

f é o fator de conversão da curva de calibração (mg/mL);

r é a razão volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g).

0,5 é o volume total do meio de reação (mL);

0,18 é o fator de conversão de mg para μmol de glicose;

10 é o tempo de reação (min);

0,25 é o volume da enzima no meio de reação (mL).

3.1.6.2. FPase

A quantificação da atividade enzimática FPase (celulase total) foi realizada utilizando papel de filtro Whatman nº 1 como substrato de acordo com metodologia adaptada de Ghose (1987). Foram adicionadas em tubos de ensaio das amostras tiras de papel de filtro (1 cm x 6 cm) em forma espiral e 1 mL de solução tampão citrato de sódio (pH 4,8 e 50 mM) juntamente com 0,5

mL de extrato enzimático. Nos tubos de ensaio correspondentes aos brancos das amostras, apenas o papel de filtro não foi adicionado. Todos os tubos foram agitados e levados ao aquecimento em banho-maria por 60 min a 50 °C. Terminado esse tempo, 0,5 mL de cada tubo foram transferidos para novos tubos contendo 0,5 mL de DNS. Todos os tubos foram novamente agitados e levados ao aquecimento em banho-maria por 5 min a 100 °C. As amostras foram, então, resfriadas em banho de gelo e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, após diluição com 6,5 mL de água destilada. O valor da atividade enzimática FPase foi calculado por meio da Equação 6:

$$\text{FPase (U/g)} = \frac{(A - B) * f * r * 1,5}{0,18 * 60 * 0,5} \quad (6)$$

Onde: A é a absorbância da amostra;

B é a absorbância do controle da amostra;

f é o fator de conversão da curva de calibração (mg/mL);

r é a razão volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g).

1,5 é o volume total do meio de reação (mL);

0,18 é o fator de conversão de mg para µmol de glicose;

60 é o tempo de reação (min);

0,5 é o volume da enzima no meio de reação (mL).

3.1.6.3. β-glicosidase

A atividade β-glicosidase foi determinada de acordo com a metodologia padrão descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987) utilizando um kit comercial de glicose-oxidase (Glucose Liquiform, LABTEST) e celobiose.

O meio reacional foi formado por 0,25 mL de uma solução de celobiose 15 mM em tampão citrato de sódio (50 mM e pH 4,8) e 0,25 mL do extrato enzimático. Nos tubos de ensaio correspondentes aos brancos das amostras, foram adicionados 0,25 mL de tampão citrato em vez da solução de celobiose. A mistura reacional foi incubada a 50 °C, durante 30 min. Após isso, todos os tubos foram transferidos para um banho-maria a 100 °C por 5 min e resfriados em banho de gelo logo em seguida.

Em novos tubos de ensaio, foram adicionados 10 µL de cada tubo anterior, seguidos de 1 mL do reagente 1 do kit glicose-oxidase. A mistura foi deixada em repouso por 10 min em temperatura ambiente para que pudesse reagir. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 500 nm, não sendo necessário diluir a amostra. O valor da atividade enzimática β-glicosidase foi calculado por meio da Equação 7:

$$\beta - \text{glicosidase (U/g)} = \frac{(A - B) * f * r * 0,5}{0,18 * 30 * 0,25} \quad (7)$$

Onde: A é a absorbância da amostra;

B é a absorbância do controle da amostra;

f é o fator de conversão da curva de calibração (mg/mL);

r é a razão volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g).

0,5 é o volume total do meio de reação (mL);

0,18 é o fator de conversão de mg para µmol de glicose;

30 é o tempo de reação (min);

0,25 é o volume da enzima no meio de reação (mL);

3.2. Obtenção e concentração do extrato enzimático bruto

O extrato enzimático bruto, obtido da melhor condição de cultivo apresentada no item 3.1.5, foi concentrado por liofilização. Para tanto, 8 L de extrato enzimático foram liofilizados (-48 °C) e, ao final do processo, foram obtidos 150 mL de extrato concentrado. Cada 50 mL de extrato liofilizado foi ressuscitado em 1 mL de solução tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8). Por fim, foi realizada a atividade enzimática FPase do extrato enzimático, de acordo com tópico 3.1.6.2) para avaliar a eficiência do processo.

3.3. Pré-tratamento do sabugo de milho

3.3.1. Caracterização lignocelulósica do sabugo de milho

A caracterização lignocelulósica do sabugo de milho foi realizada através da metodologia descrita por Morais et al. (2010). Essa caracterização visou determinar o percentual em massa dos teores de cinzas e extrativos, além das frações lignocelulósicas como hemicelulose, celulose e lignina insolúvel. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O cálculo das porcentagens de remoção dos componentes foi realizado por meio das Equações 8 e 9.

$$X_f = (R * X) / 100 \quad (8)$$

Onde: X_f é o teor corrigido do componente após pré-tratamento (%);

R é o rendimento (%) calculado por meio da Eq. 14;

X é o teor do componente após pré-tratamento (%).

$$RE = X_n / (X_f * 100) \quad (9)$$

Onde: RE é a porcentagem de remoção do componente (%);

X_n é o teor do componente in natura (%).

3.3.2. Planejamento experimental

Para esta etapa, três tipos de pré-tratamento foram aplicados no sabugo de milho: dois pré-tratamentos químicos, usando ácido sulfúrico e hidróxido de sódio como reagentes, e um pré-tratamento físico, utilizando água destilada (pré-tratamento hidrotérmico).

Nos pré-tratamentos químicos, seguiu-se um planejamento fatorial experimental de 2^3 com três repetições no ponto central totalizando 11 experimentos, tendo como fatores a temperatura ($^{\circ}\text{C}$), o tempo (min) e a concentração da solução (% m/v). As respostas avaliadas foram o teor de AR e de lignina solúvel (LS) liberados ao fim de cada reação. A Tabela 3 apresenta os níveis de cada fator. É importante destacar que as escolhas dos níveis das variáveis seguiram critérios relacionados com limitações e valores previamente conhecidos. Para a variável tempo, os níveis foram escolhidos de acordo com trabalhos da literatura (SILVA, 2009; CARVALHO, 2011; SANTOS, 2014).

O pré-tratamento hidrotérmico, por sua vez, utilizou os mesmos níveis dos fatores tempo e temperatura utilizados para os pré-tratamentos químicos, desta vez para um planejamento fatorial experimental de 2^2 com três repetições no ponto central, totalizando 7 experimentos.

Tabela 3. Fatores e seus níveis correspondentes para os planejamentos experimentais dos pré-tratamentos químicos.

Fatores	Codificação	Níveis		
		-1	0	+1
Tempo (min)	t	10	40	70
Temperatura (°C)	T	40	70	100
Concentração (% m/v)	CR	1	2	3

Os fatores e as respostas foram correlacionados por meio de modelos lineares, na qual y representa a variável de resposta (AR ou LS); β_0 a β_6 são os coeficientes do modelo de regressão e t , T e CR representam os níveis codificados dos fatores. A Equação 10 representa a equação do modelo codificado para os pré-tratamentos químicos e a Equação 11, para o pré-tratamento hidrotérmico.

$$y = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 T + \beta_3 CR + \beta_4(t \cdot T) + \beta_5(t \cdot CR) + \beta_6(T \cdot CR) \quad (10)$$

$$y = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 T + \beta_4(t \cdot T) \quad (11)$$

A proporção de sabugo/solução utilizada foi a mesma, sendo 1:20 (m/v). Utilizou-se banho térmico e autoclave para manter as temperaturas desejadas. Os experimentos foram realizados em béqueres de 125 mL com 2 g de amostra e 40 mL de volume final, e a mistura foi filtrada em papel de filtro qualitativo para a análise do extrato. Com o extrato obtido, procedeu-se com a análise das variáveis de resposta.

Para a análise de açúcares redutores, o procedimento utilizado foi aquele descrito por Miller (1959). O meio reacional foi formado por 0,5 mL do extrato a ser obtido e 0,5 mL de solução de DNS e incubado por 5 min a 100 °C. A reação enzimática foi interrompida com um banho de gelo e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, após diluição com 4,0 mL

de água destilada. O valor da concentração de AR foi, então, calculado por meio da Equação 12 a seguir:

$$AR = \text{abs} * f * d \quad (12)$$

Onde: AR é o teor de açúcares redutores (g/L);

abs é o valor da absorvância;

f é o fator de conversão da curva de calibração;

d é a diluição da amostra (mL/g), se houver.

Para a LS, seguiu-se o seguinte procedimento: utilizou-se o método proposto por Goldschmidt (1971), no qual se realiza uma varredura da absorvância de 280 nm a 215 nm. A amostra deve ser diluída, se necessário, com ácido sulfúrico 4% até que a absorvância fique menor do que 1,0. Com base nos valores obtidos, foi empregada a Equação 13, na qual CLS representa a concentração de LS, em g/L, A_{215} representa a absorvância a 215 nm e A_{280} representa a absorvância a 280 nm.

$$CLS(\text{g/L}) = \frac{4,53 * A_{215} * A_{280}}{300} \quad (13)$$

A partir da comparação dos resultados obtidos das variáveis de resposta, escolheu-se a condição que promoveu uma maior liberação de AR e LS tanto no pré-tratamento alcalino como no ácido. Foram utilizadas a melhor temperatura, tempo e concentração para tratar 250 g de sabugo de milho, que foram utilizados na etapa de hidrólise. O sabugo, depois de ser devidamente pré-tratado, foi filtrado utilizando uma aparelhagem composta por kitassato, funil de porcelana e papel de filtro. O filtrado foi constantemente lavado com água destilada até que o pH ficasse próximo ao da água que estava sendo utilizada. Após isso, o sabugo pré-tratado foi seco em estufa a 60 °C por cerca de 48 h e armazenado em recipiente fechado e em temperatura ambiente. O rendimento em massa foi calculado por meio da Equação 14:

$$R = \frac{m_f}{m_i} * 100 \quad (14)$$

Onde: R é o rendimento em massa (%);

m_f é a massa final de sabugo pré-tratado após secagem na estufa (g);

m_i é a massa inicial de sabugo antes do pré-tratamento (g).

3.4. Hidrólise enzimática

As hidrólises foram realizadas em duplicata, de acordo com metodologia adaptada de Carvalho-Gonçalves (2017) e com os três tipos de sabugo pré-tratados na melhor condição obtida como resposta, em cada um dos planejamentos experimentais. Os sabugos foram hidrolisados utilizando o extrato enzimático bruto após liofilização e também pela celulase comercial Celluclast®, de modo a avaliar a eficiência das enzimas produzidas por *Penicillium* sp. FSDE15. As hidrólises foram realizadas em erlenmeyers de 125 mL nas seguintes condições: volume total de mistura de 50 mL (extrato concentrado e tampão citrato de sódio pH 4,8 e 50 mM), porcentagem de sabugo de 5 % (m/v) do volume total, carga enzimática de 10 FPU/g e temperatura de 50 °C.

Os erlenmeyers foram incubados em *shaker* com rotação mantida a 100 rpm durante 48 h de hidrólise. Ao longo da hidrólise, alíquotas de 1 mL do líquido reacional foram coletadas em períodos de tempo pré-determinados de 0, ½, 1, 2, 4, 6, 8, 18, 24 e 48 h e imediatamente congeladas para posterior análise das concentrações de AR.

A conversão máxima da celulose e hemicelulose em glicose foi feita por meio da equação 15:

$$\eta = \frac{t_g * \gamma}{t_i * (\mu_c + \mu_h)} * 100 \quad (15)$$

Onde: η é a conversão máxima da celulose (%);

t_g é o teor de glicose no hidrolisado (g/L);

γ é a média do fator de hidrólise da celulose (0,90) e hemicelulose (0,88);

t_i é o teor de material lignocelulósico antes da hidrólise (g/L) e equivale a 50;

μ_c é teor de celulose inicial no material lignocelulósico pré-tratado;

μ_h é o teor de hemicelulose inicial no material lignocelulósico pré-tratado.

Já o cálculo da produtividade foi realizado de acordo com a equação 16:

$$P = t_{AR}/t \quad (16)$$

Onde: P é a produtividade (g/L.h);

t_{AR} é o teor de AR (g/L);

t é o tempo de hidrólise (h).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da produção de celulasas usando sabugo de milho

4.1.1. Caracterização físico-química dos substratos

Os resultados da caracterização físico-química quanto ao pH, teor de sólidos solúveis, umidade, massa específica real, massa específica aparente, porosidade, AR e proteína total podem ser visualizados na Tabela 4. O resultado representa a média aritmética das análises, que foram realizadas em triplicata.

Tabela 4. Parâmetros da caracterização físico-química do farelo de trigo e sabugo de milho.

Parâmetro	Unidade	Farelo de trigo	Sabugo de milho
pH	-	6,55 ± 0,06	5,07 ± 0,04
Teor de sólidos solúveis	°Brix	1,30 ± 0,20	0,87 ± 0,16
Umidade	%	11,70 ± 0,57	4,63 ± 0,32
Massa específica real	g/mL	0,77 ± 0,05	0,78 ± 0,01
Massa específica aparente	g/mL	0,37 ± 0,00	0,15 ± 0,00
Porosidade	-	0,85 ± 0,00	0,77 ± 0,00
Açúcares redutores	g/L	1,20 ± 0,08	1,36 ± 0,05
Proteína total	%	9,93 ± 0,65	3,69 ± 0,09

O pH do farelo de trigo (6,55) é próximo à neutralidade o que, para o crescimento de fungos, não é muito favorável. Já o pH do sabugo de milho (5,07) é mais ácido, favorecendo, assim, o desenvolvimento de fungos no meio de cultivo.

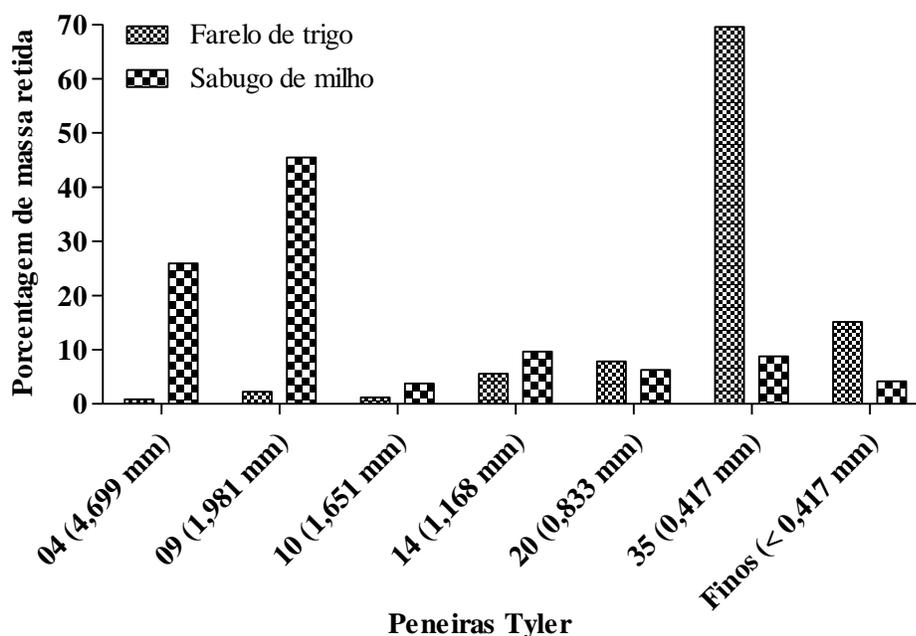
Os teores de sólidos solúveis, que foram de 1,30 °Brix para o farelo e 0,87 °Brix para o sabugo, são extremamente baixos e estão de acordo com os valores encontrados para o teor de açúcares redutores, evidenciando a pouca presença de açúcares nos mesmos. A presença de açúcares nos substratos pode provocar repressão catabólica. Mas, com os valores encontrados, é provável que não ocorra repressão catabólica na síntese das enzimas de interesse (SOUZA; SOUZA; PERALTA 2001).

Os teores de umidade encontrados variam de 4,5 a 12%; com esses valores, os substratos podem ser armazenados à temperatura ambiente sem que haja proliferação de microrganismos indesejáveis durante o período dos experimentos, permitindo usar o mesmo substrato (SANTOS, 2007, MÉLO et al., 2015).

As massas específicas aparentes encontradas para o farelo e sabugo foram de 0,37 e 0,15 g/mL, respectivamente. Esses valores são considerados baixos, revelando que os materiais tendem a não se compactar completamente. A baixa massa específica, juntamente com a alta porosidade dos resíduos, cria espaços vazios que são responsáveis pela circulação de ar e facilitam a transferência de massa e energia, fatores favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos quando se trabalha com cultivo em estado sólido. A alta porosidade também desempenha um papel importante na posterior etapa de extração enzimática (SANTOS, 2007; MÉLO et al., 2015).

O perfil granulométrico de ambos os resíduos pode ser visualizado na Figura 7. Como pode ser observado, aproximadamente 70% do farelo de trigo é composto de partículas com diâmetro médio de 35, o que corresponde a 0,417 milímetros. O sabugo de milho, por sua vez, possui cerca de 71% de suas partículas com diâmetro médio de 04-09 (1,981-4,669 mm). Segundo Amorim (2017), partículas muito pequenas oferecem maior área superficial ao ataque do microrganismo, mas também sofrem compactação facilmente.

Figura 7. Distribuição granulométrica dos resíduos de farelo de trigo e sabugo de milho.



Correia (2004) estudou o enriquecimento proteico de resíduo proveniente do abacaxi e trabalhou com partículas de diâmetro médio maior que 0,417 mm. Mélo et al. (2015) produziu enzimas celulases por fermentação em estado sólido utilizando resíduo de acerola com partículas de diâmetro médio de 0,40 mm, obtendo bons resultados.

Em seu estudo, Muniswaran e Charyulu (1994) obtiveram produções máximas de CMCase, FPase e β -glicosidase quando utilizaram partículas com diâmetro médio de 0,375 mm, enquanto que menores valores de atividade enzimática foram obtidos quando utilizaram partículas maiores ou menores. Partículas pequenas oferecem uma maior área superficial para crescimento do microrganismo e uma menor porosidade, que diminui a oxigenação do meio. Nas partículas maiores, entretanto, o comportamento é o oposto. Isso mostra que esses dois fatores estão ligados entre si.

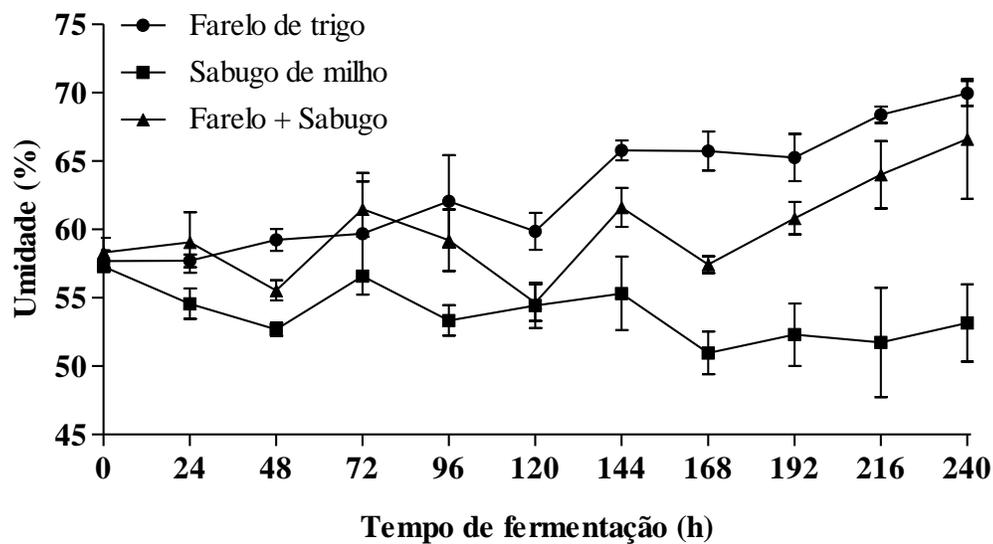
No presente trabalho, foram utilizados sabugo e farelo como substratos para produção das enzimas de interesse. O farelo, por ser composto por partículas com diâmetro médio menor, é responsável por aumentar a área superficial disponível ao microrganismo. Já o sabugo, por ser composto de partículas maiores, evita que haja compactação do meio e melhorar a dispersão de oxigênio.

Em relação ao teor de proteínas totais, Ziglio et al. (2007) encontraram valores de 2,5 e 8,3% para a farinha de sabugo e farelo de trigo, respectivamente. Neiva Júnior et al. (2007) obtiveram um valor de proteínas totais de 2,4% para o sabugo. Esses valores estão próximos e de acordo com os teores encontrados nesse trabalho, que foram de 3,69% para o sabugo e 9,93% para o farelo.

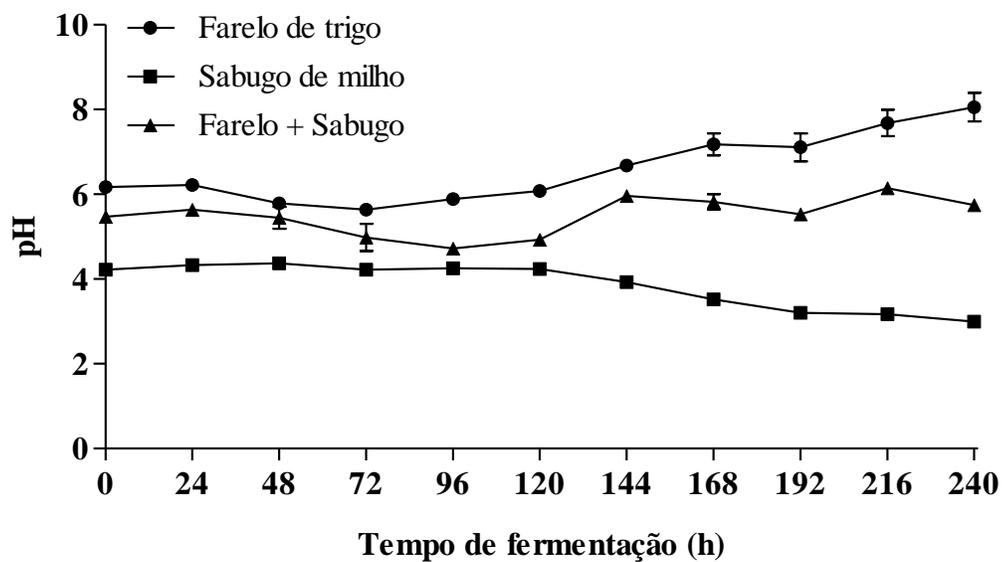
4.1.2. Ensaio fermentativos

Uma comparação entre os cultivos realizados e seus diferentes valores de umidade e pH está relacionada na Figura 8.

Figura 8. Comparação entre os valores de umidade (a) e pH (b) para os diferentes cultivos.



(a)



(b)

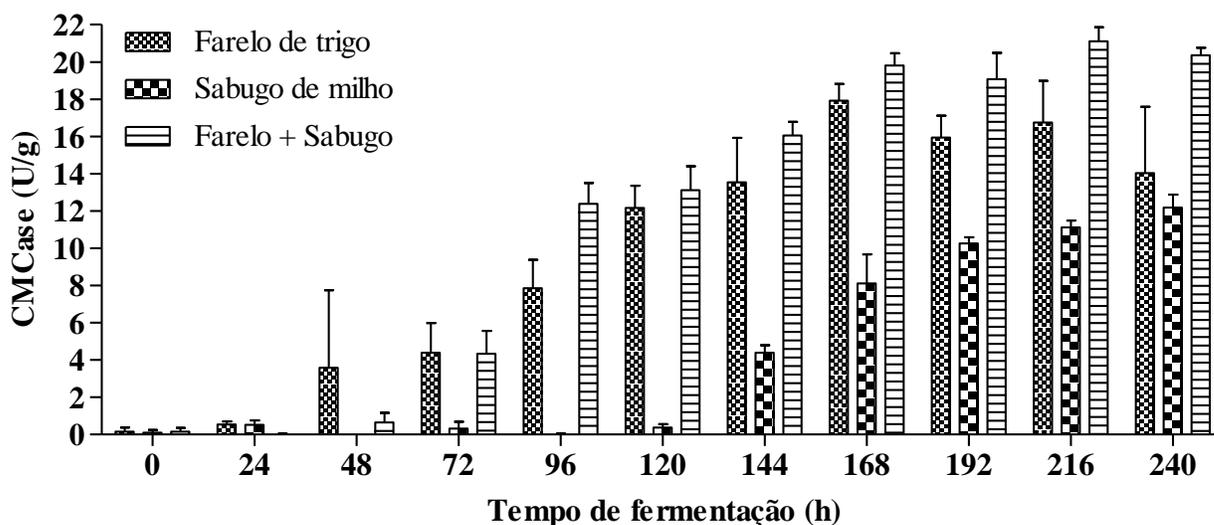
Todos os cultivos estiveram na faixa de umidade de 50-70% durante os dez dias de cultivo. Jecu (2000) estudou o efeito da umidade em ensaios fermentativos utilizando uma espécie fúngica de *Aspergillus niger* e farelo de palha de trigo como substratos. Os resultados obtidos mostraram

que umidades entre 55 e 74% favoreceram o aumento da atividade enzimática, enquanto que acima de 80% tiveram um efeito negativo na produção de enzimas celulolíticas. Isso mostra que, em relação à umidade, o fungo *Penicillium* sp. FSDE15 teve oportunidade de crescimento e multiplicação em todos os cultivos realizados. Em nenhum momento a umidade ficou abaixo ou acima do esperado.

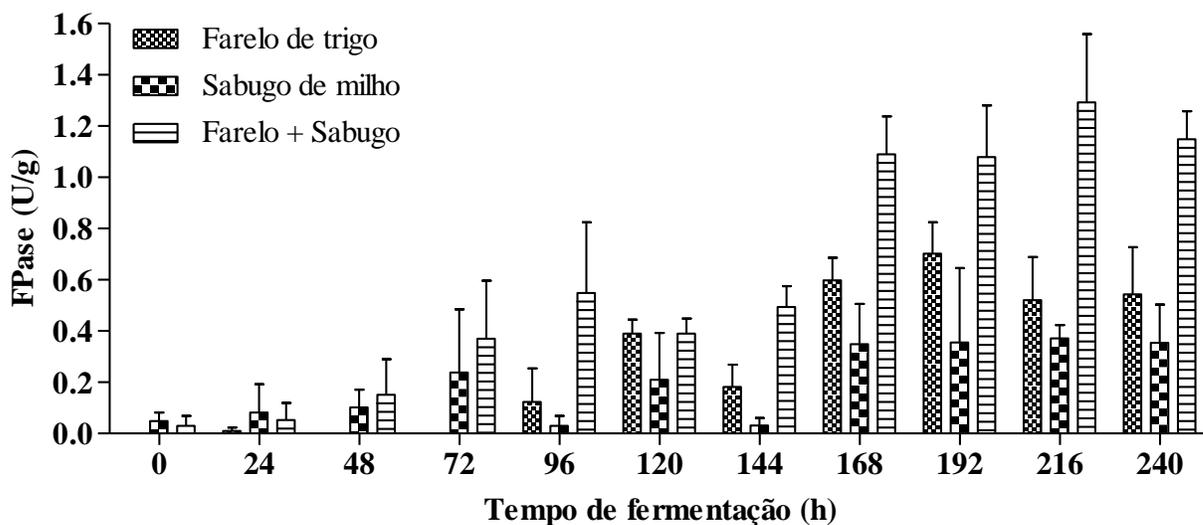
Quanto ao pH, observou-se uma variação ampla (3,0 a 8,0), indicando que o pH inicial da biomassa lignocelulósica tem grande influência no cultivo. O pH é uma variável muito difícil ser controlada no cultivo em estado sólido devido à ausência de água livre e a adição de um reagente ácido/alcalino para corrigi-lo pode causar problemas como alteração de umidade e dificuldade de homogeneização. Por isso, é importante que sejam usados microrganismos aptos a crescer em uma faixa de pH ampla. Os fungos filamentosos são capazes de se desenvolver, idealmente, em uma faixa de pH que varia de 3 a 5 (SAUCEDO-CASTAÑEDA et al., 1992; MANPREET et al., 2005; MÉLO et al., 2015).

A Figura 9 relaciona a produção das enzimas CMCase (a), FPase (b) e β -glicosidase (c) ao longo de 240 h de fermentação, para cultivos realizados com o *Penicillium* sp. FSDE15, usando farelo de trigo e sabugo de milho como substratos.

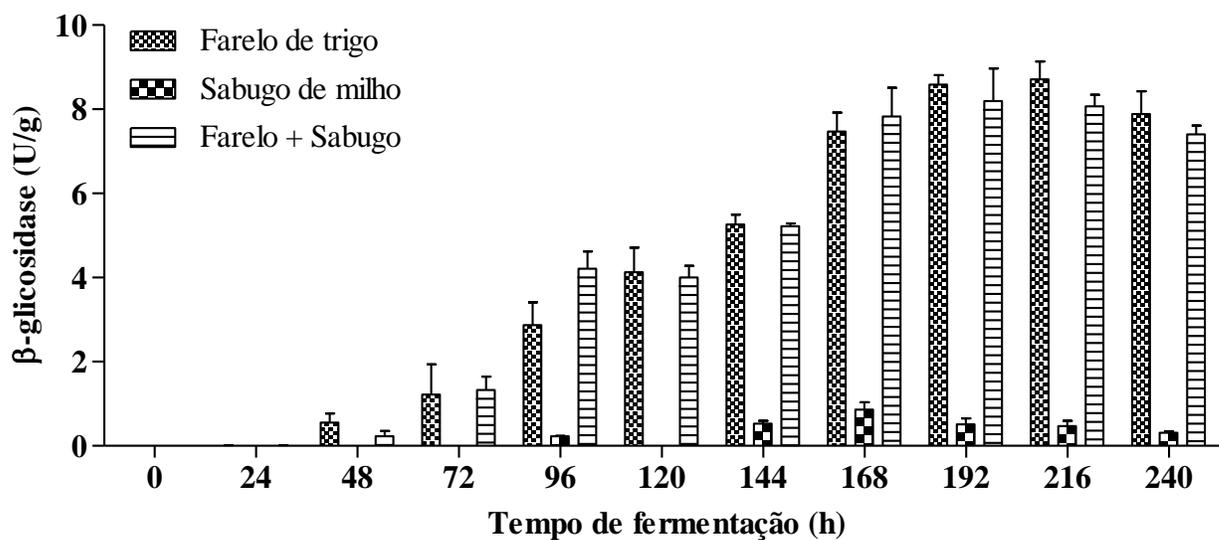
Figura 9. Produção de CMCase (a), FPase (b) e β -glicosidase (c), por *Penicillium* sp. FSDE15 para ensaios realizados com farelo de trigo e sabugo de milho fontes de carbono. Os dados estão representados pelas médias \pm desvios-padrão.



(a)



(b)



(c)

Como mostrado na Figura 9a, a máxima produção de CMCase (endoglicanase) para o cultivo realizado com o farelo de trigo puro foi de $17,92 \pm 0,89$ U/g ($1,19 \pm 0,06$ U/mL) em 168 h. Para os cultivos realizados com sabugo de milho puro e a combinação de sabugo e farelo na proporção de 50% como substratos, os maiores valores encontrados foram de $12,18 \pm 0,71$ U/g ($0,81 \pm 0,05$ U/mL) em 240 h e $21,11 \pm 0,74$ U/g ($1,41 \pm 0,05$ U/mL) em 216 h, respectivamente.

Assim, em termos de produtividade do processo, o tempo de cultivo será o de 168 h, sendo melhor utilizar a mistura de farelo de trigo e sabugo de milho.

Já analisando a produção da enzima FPase (celulase total) na Figura 9b, a máxima produção obtida para o cultivo com o farelo foi de $0,70 \pm 0,12$ U/g ($0,046 \pm 0,008$ U/mL) em 192 h de cultivo. Para os cultivos realizados com sabugo de milho e a combinação de sabugo e farelo na proporção de 50% como substratos, os maiores valores encontrados foram de $0,37 \pm 0,05$ U/g ($0,025 \pm 0,003$ U/mL) em 216 h e $1,29 \pm 0,27$ U/g ($0,086 \pm 0,018$ U/mL) também em 216 h, respectivamente. Da mesma forma que para CMCCase, atividade FPase teve maior produtividade no tempo de cultivo 168 h. Para ambas as enzimas, percebe-se que a mistura de farelo e sabugo foi a condição que promoveu os maiores valores de atividade. Uma possível explicação é que o farelo possui um valor nutricional melhor que o sabugo e este, por sua vez, apresenta um pH menor e uma maior granulometria, o que veio a contribuir para oxigenação e não-compactação do meio, favorecendo assim a síntese de enzimas.

A produção de β -glicosidase (Figura 9c) atingiu sua máxima produção para o cultivo realizado com farelo puro como substrato, com um valor de $8,72 \pm 0,42$ U/g ($0,58 \pm 0,03$ U/mL) em 216h de fermentação. Para o cultivo realizado com farelo e sabugo na proporção 50%, o maior valor foi de $8,21 \pm 0,78$ U/g ($0,55 \pm 0,05$ U/mL), em 192 h, valor muito próximo do utilizando somente o farelo. Entretanto, a produção dessa enzima utilizando apenas sabugo de milho puro como substrato não atingiu valores consideráveis.

Analisando o conjunto das três enzimas, que são necessárias para hidrólise do sabugo, percebe-se que a sua adição como substrato melhorou a produção das FPases, com um aumento de 54% quando são comparados os valores para farelo puro e mistura de farelo e sabugo, no tempo de 196 h. Ao mesmo tempo, manteve atividades de CMCCase e β -glicosidase próximas entre si. O farelo de trigo é o subproduto da produção do trigo, já vendido comercialmente como ração animal, tendo assim um custo maior que o sabugo de milho, que não é processado e geralmente se acumula no meio ambiente.

Analisando os resultados de Rocha (2016), as melhores produções de CMCCase, FPase e β -glicosidase por *Penicillium* sp. FSDE15 foram de $1,0 \pm 0,1$ U/mL, $0,06 \pm 0,01$ U/mL e $0,4 \pm 0,1$ u/mL respectivamente, após 120 h de fermentação pelo método do cultivo em estado submerso, usando palha de cana pré-tratada com hidróxido de sódio como substrato. Comparando esses resultados com os obtidos neste trabalho, observa-se que o cultivo em estado sólido proporcionou uma maior produção de enzimas CMCCase e β -glicosidase para os cultivos realizados com o farelo

puro e com a combinação de farelo e sabugo, evidenciando, assim, o potencial desse tipo de cultivo. A produção da enzima FPase também foi maior utilizando farelo e sabugo na proporção 50%, o que demonstra o grande desempenho do uso combinado desses dois resíduos.

De acordo com Bonfim (2015), o ensaio fermentativo realizado com o *Penicillium* sp. FSDE15 utilizando farelo de trigo puro como substrato, concentração de esporos de 10^6 esporos/g de substrato e umidade de 50% apresentou um pico de atividade CMCase de 6,256 U/g a 96 h de cultivo. Logo, este valor atividade CMCase foi menor se comparado com o obtido neste trabalho com o mesmo substrato e no mesmo tempo de fermentação, que foi de 7,85 U/g. Aleixo Júnior (2018), por sua vez, obteve uma produção de CMCase de 11,4 U/g em 120 h de fermentação utilizando o mesmo fungo e farelo de trigo como substrato nas condições de 70% de umidade e concentração de esporos de 10^5 esporos/g. Esse valor é menor que o encontrado neste trabalho (12,16 U/g).

Castro e Pereira Jr. (2009) obtiveram valores de endoglicanase e celobiase de 1,60 U/mL e 0,21 U/mL, respectivamente, utilizando o bagaço de cana-de-açúcar e o fungo *Penicillium funiculosum*. Mais uma vez, é possível provar que o *Penicillium* sp. FSDE15 possui imenso potencial para a produção de enzimas celulolíticas.

Pirota et al. (2016) estudaram a influência da temperatura e da umidade inicial do meio na produção de celulasas por fermentação em estado sólido do farelo de trigo usando a espécie *Aspergillus oryzae* e obtiveram uma produção de FPase de, aproximadamente, 0,10 U/g nas condições de 70% de umidade, temperatura de 30 °C e 72 h de fermentação. Estes valores são inferiores quando comparados aos encontrados neste trabalho, evidenciando que a combinação do sabugo juntamente com o farelo é capaz de gerar bons resultados.

Em outro estudo na mesma área, Pirota, Delabona e Farinas (2014) obtiveram uma produção de β -glicosidase de 1,20 U/g utilizando *Trichoderma reesei* Rut C30 em condições de umidade e temperatura de 60% e 35 °C, respectivamente. A produção de FPase, por sua vez, foi de 0,40 U/g a partir da espécie *Aspergillus niger* 3T5B8, em condições de 80% de umidade e 28 °C temperatura. Ambos os estudos foram realizados com farelo de trigo como substrato e demonstram que os resultados encontrados neste trabalho foram superiores.

O acompanhamento do crescimento do *Penicillium* sp. FSDE15 nos diferentes cultivos pode ser visto por meio da Figura 10 abaixo.

Figura 10. Crescimento do *Penicillium* sp. FSDE15 nos tempos de 0, 72, 144 e 240 h para os cultivos com farelo de trigo puro (a), sabugo de milho puro (b) e sabugo + farelo (c).



(a)



(b)



(c)

Percebe-se, pela Figura 10a e c, que os cultivos com farelo de trigo e na combinação de farelo e sabugo apresentaram crescimento rapidamente, onde, em 72 h de fermentação, é possível

visualizar os esporos. Entretanto, o crescimento do fungo no cultivo com sabugo de milho (Figura 10b) não pôde ser observado a 72 h. De fato, este apenas começou a crescer em 120 h e isto está de acordo com os valores de CMC_{case} mostrados na Figura 9a.

4.2. Avaliação dos pré-tratamentos do sabugo de milho

4.2.1. Caracterização lignocelulósica do sabugo

A caracterização lignocelulósica procedeu-se em triplicata e os resultados mostrados na Tabela 5 são apresentados como média aritmética dos três valores obtidos.

Tabela 5. Comparação da composição química do sabugo de milho in natura.

Componentes (%)	Autor (2021)	Lopes (2015)	Lucarini et al. (2015)	Ling et al. (2017)
Celulose	32,74	35,96	32,01	40,10
Hemicelulose	28,72	36,32	60,48	33,20
Lignina insolúvel	32,13	16,88	10,20	18,90
Extrativos	1,10 ± 0,32	-*	-*	2,88
Cinzas	1,90 ± 0,10	1,75	0,53	-
Total	96,58	92,88	99,64	95,08

*as amostras já se encontravam livres de extrativos.

Fonte: LOPES, 2015; LUCARINI et al., 2015; LING et al., 2017.

O percentual de celulose encontrado no sabugo de milho utilizado foi de 32,74%. Comparando esse valor com os dados obtidos por outros autores, percebe-se que os percentuais estão bem próximos entre si. É necessário considerar que estas variações dependem da variedade de milho e das condições climáticas do cultivo. Ainda assim, é possível afirmar que o teor de celulose encontrado é considerado alto, tornando o sabugo uma excelente biomassa para a produção de etanol de segunda geração (PITARELO, 2013).

O teor de cinzas apresentado pelo sabugo (1,90%) foi condizente com a literatura, se aproximando dos valores de 1,75% encontrado por Lopes (2015), 1,80% por Araújo et al. (2016) e 1,39% por Aboagye et al. (2017).

Já o teor de lignina insolúvel encontrado foi elevado (32,13%), o que justifica a necessidade de um pré-tratamento de biomassa a fim de modificar sua estrutura e permitir o ataque enzimático à celulose (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009).

4.2.2. Pré-tratamento do sabugo de milho

O estudo do pré-tratamento químico foi realizado utilizando-se a ferramenta do planejamento fatorial experimental, com o intuito de avaliar a influência de três variáveis independentes: tempo (min), temperatura (°C) e concentração de reagente (%). Dois reagentes diferentes foram testados: H₂SO₄ para um pré-tratamento ácido e NaOH para o alcalino, além de água destilada para o pré-tratamento hidrotérmico. As variáveis de resposta analisadas foram o teor de AR e LS liberados no fim de cada reação.

4.2.2.1. Pré-tratamento ácido

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos para o planejamento fatorial experimental 2³ utilizando H₂SO₄ como reagente.

Tabela 6. Resultados do planejamento experimental 2³ para o pré-tratamento com H₂SO₄.

Experimento	t (min)	T (°C)	CR (%)	AR (g/L)	LS (g/L)
1	-1 (10)	-1 (40)	-1 (1)	0,87	2,42
2	+1 (70)	-1 (40)	-1 (1)	2,69	2,55
3	-1 (10)	+1 (100)	-1 (1)	2,25	2,60
4	+1 (70)	+1 (100)	-1 (1)	19,99	3,41
5	-1 (10)	-1 (40)	+1 (3)	0,83	2,38
6	+1 (70)	-1 (40)	+1 (3)	3,47	2,42
7	-1 (10)	+1 (100)	+1 (3)	5,80	2,97
8	+1 (70)	+1 (100)	+1 (3)	25,77	3,02
9	0 (40)	0 (70)	0 (2)	1,45	2,39
10	0 (40)	0 (70)	0 (2)	1,19	2,67
11	0 (40)	0 (70)	0 (2)	0,30	2,52

Os dados obtidos foram tratados utilizando o *software* Statistica 7.0 e foram analisados empregando um intervalo de 95% de confiança. As Tabelas 7 e 8 abaixo representam a ANOVA e o teste F (Probabilidade de Fisher) para cada modelo. Se o F calculado for maior que o F tabelado, então o modelo é estatisticamente significativo, ou seja, o modelo representa bem os resultados obtidos. O F tabelado é encontrado a partir de tabelas que relacionam o intervalo de confiança e os graus de liberdade da regressão e do resíduo. Neste caso, foram utilizadas as tabelas fornecidas por Rodrigues e Iemma (2014).

Tabela 7. Análise de variância para a resposta AR no pré-tratamento ácido.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F calculado/ F tabelado
Regressão	624,3913	3	208,1304	11,87	
Resíduo	122,7790	7	17,5398	F tabelado	2,73
Total	747,1703	10	-	4,35	

Tabela 8. Análise de variância para a resposta LS no pré-tratamento ácido.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F calculado/ F tabelado
Regressão	0,915797	6	0,152633	3,39	
Resíduo	0,180170	4	0,0450425	F tabelado	0,55
Total	1,095967	10	-	6,16	

Pode-se perceber que o modelo da variável de resposta AR é estatisticamente significativo, uma vez que o valor do F (11,87) foi maior que o F tabelado (4,35). O modelo para LS, entretanto, não é estatisticamente significativo. O modelo codificado, que representa a resposta para AR, está representado pela Equação 15 abaixo:

$$AR = 5,87 + 5,27t + 5,74T + 1,26CR + 4,15(t.T) + 0,38(t.CR) + 1,07(T.CR) \quad (15)$$

Por meio do uso do *software*, o modelo obtido para a resposta AR foi reparametrizado, fazendo com que o coeficiente da interação tempo e temperatura se tornasse significativo, com um

valor de 4,15. Na reparametrização, um fator pode ser eliminado do processo (neste caso, CR) de modo a tornar uma outra interação do modelo significativa. A nova Equação do modelo é:

$$AR = 5,87 + 5,27t + 5,74T + 4,15(t.T) \quad (16)$$

Analisando os diagramas de Pareto (Figuras 11 e 12) para cada resposta, verificou-se que os fatores tempo e temperatura apresentaram significância ($p < 0,05$) para o teor de AR, ou seja, quanto maior o tempo e maior temperatura maior será a concentração de AR obtidos, usando as concentrações de ácido avaliadas.

Para o teor de LS, apenas o fator temperatura foi estatisticamente significativo. Assim o maior teor de lignina será obtido na maior temperatura usada independente da concentração de ácido ou tempo do processo, nas faixas usadas. Os coeficientes de correlação (R^2) foram de 0,87 para AR e 0,84 para LS.

Figura 11. Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis tempo, temperatura e concentração de H_2SO_4 no teor de AR.

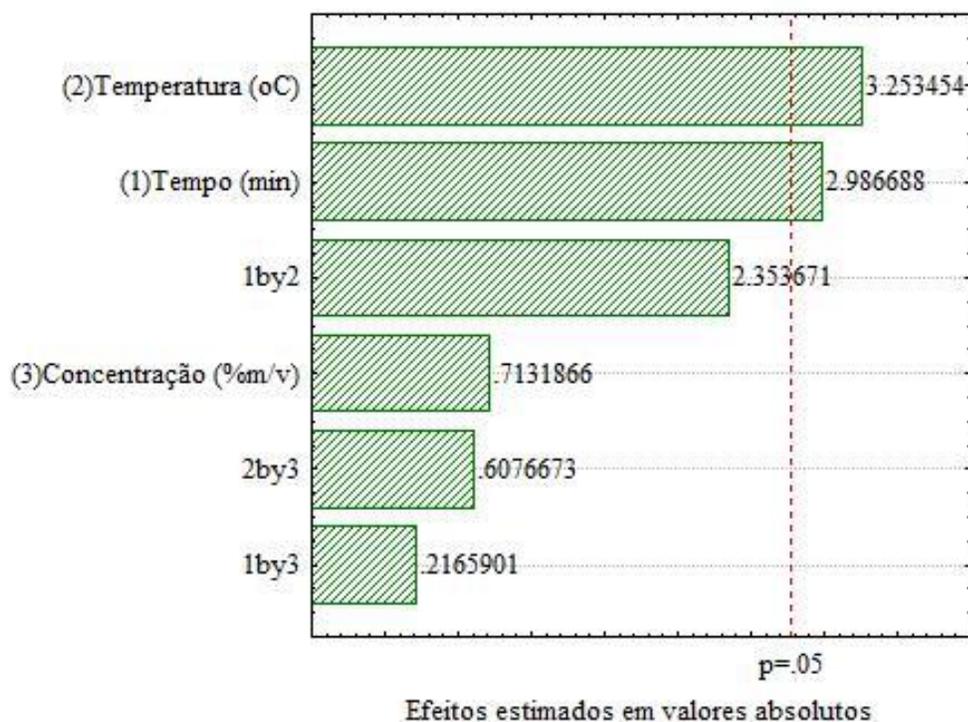
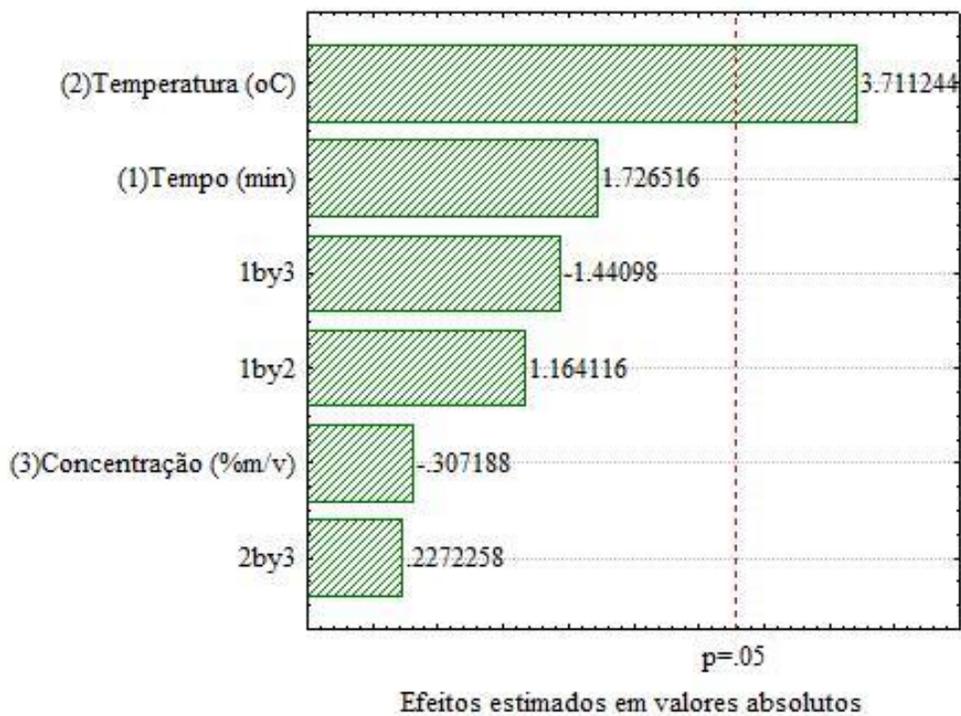
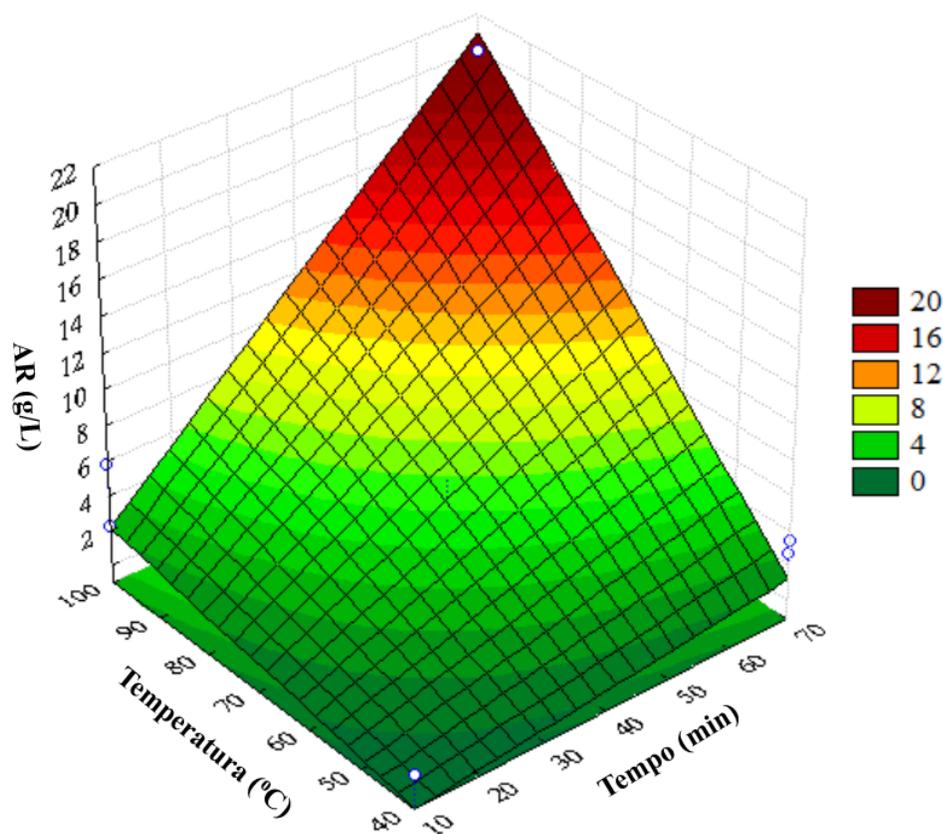


Figura 12. Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis tempo, temperatura e concentração de H₂SO₄ no teor de LS.



O gráfico da superfície de resposta obtido para a variável de resposta AR está mostrado na Figura 13. A concentração de reagente, que não foi significativa no processo, foi fixada no ponto central (2%).

Figura 13. Superfície de resposta para o teor de AR em função do tempo e temperatura no pré-tratamento ácido.



A análise da superfície de resposta da Figura 13 permite observar que a região com a maior teor de AR (em vermelho escuro) está localizada nos pontos nos quais a temperatura está acima de 100 °C e o tempo de reação acima de 70 min, ou seja, o teor de AR é diretamente proporcional ao aumento desses dois fatores. Logo, uma maior temperatura e um maior tempo de reação irão gerar uma maior concentração de AR. Isso já era esperado, pois o aumento dessas variáveis implica aumento na severidade do processo de pré-tratamento (NASCIMENTO, 2011).

Levando em conta que o objetivo da hidrólise ácida é quebrar a fração hemicelulósica, comprometer a estrutura da lignina e decompor a celulose em açúcares simples (KUCHARSKA et al., 2018), o melhor resultado obtido foi o do experimento 4, com 19,99 g/L de AR e 3,41 g/L de LS, onde os níveis dos fatores tempo e temperatura são máximos e o nível para a concentração é mínimo, já que essa variável independente não é estatisticamente significativa. Com o intuito de reduzir custos e diminuir a formação de compostos inibidores, é interessante utilizar a menor concentração possível de H_2SO_4 .

A condição escolhida para o pré-tratamento ácido do sabugo de milho, a fim de utilizá-lo na hidrólise enzimática, foi: temperatura de 100 °C, tempo de reação de 70 min e concentração de H₂SO₄ de 1%. O rendimento em massa obtido após o pré-tratamento nessas condições foi de 50,55% e este valor pode ser explicado pelo fato de ter sido utilizada uma temperatura de 100 °C. Caso a temperatura fosse mais elevada, haveria uma maior solubilização da fração hemicelulósica na fase líquida, implicando em um rendimento em massa menor. Esse valor foi superior ao encontrado por Lopes et al. (2015), que obtiveram um rendimento mássico de 47,06% quando pré-trataram o sabugo por 20 min, 133 °C e concentração de H₂SO₄ de 0,5%.

Santos et al. (2015) pré-trataram o sabugo de milho com H₂SO₄ e também obtiveram os maiores percentuais de sua variável de resposta (ART) em condições de baixa concentração (0,5%) e elevadas temperaturas (120 °C). Ao trabalharem com concentrações altas (3%), houve uma redução média de 4,4% no teor de ART. Rocha et al. (2016) utilizaram temperatura, tempo e concentração de H₂SO₄ de 96 °C, 67,5 min e 2%, respectivamente, obtendo um teor de ART de 17,5 g/L, valor inferior ao encontrado neste trabalho. Isso evidencia que concentrações altas de reagente ácido nem sempre proporcionam valores mais altos de açúcares liberados.

Vieira et al. (2015) realizaram pré-tratamento do sabugo e palha de milho com H₂SO₄ a 0,5% por 15 min a 121 °C e obtiveram um teor de AR igual a 25 g/L, valor que é ligeiramente mais elevado que o encontrado neste trabalho, mas que confirma que a elevação de temperatura (que é uma variável significativa) aumenta a liberação de açúcares.

Sumphanwanich et al. (2008) obtiveram o melhor teor de ART utilizando H₂SO₄ a 1,8% como reagente por 60 min e 121 °C. Concentrações acima dessa proporcionaram queda no valor da variável de resposta, provavelmente favorecendo a formação de inibidores, como furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético e ácido lático. Silva (2018) também pré-tratou o sabugo na mesma temperatura e com o mesmo reagente, testando concentrações de 2,5 a 10,0%, tendo alcançado os melhores resultados usando a menor delas e tempo de 30 min, obtendo um teor de AR de 28,1 g/L. O sabugo utilizado possuía Tyler de 14 mesh, o que pode ter contribuído para uma melhor hidrólise ácida, já que partículas menores oferecem uma maior área superficial.

Santos (2014) relata que concentrações de reagente inferiores a 0,5% não geram resultados satisfatórios, enquanto que concentrações acima de 4% são inviáveis no que tange o gasto de material e a geração de um resíduo muito ácido/alcalino.

4.2.2.2. Pré-tratamento alcalino

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos para o planejamento fatorial experimental 2^3 utilizando hidróxido de sódio como reagente.

Tabela 9. Resultados do planejamento experimental 2^3 para o pré-tratamento com NaOH.

Experimento	t (min)	T (°C)	CR (%)	AR (g/L)	LS (g/L)
1	-1 (10)	-1 (40)	-1 (1)	2,66	3,59
2	+1 (70)	-1 (40)	-1 (1)	3,23	4,18
3	-1 (10)	+1 (100)	-1 (1)	0,37	6,41
4	+1 (70)	+1 (100)	-1 (1)	0,22	6,84
5	-1 (10)	-1 (40)	+1 (3)	3,66	5,42
6	+1 (70)	-1 (40)	+1 (3)	3,00	7,06
7	-1 (10)	+1 (100)	+1 (3)	0,04	7,61
8	+1 (70)	+1 (100)	+1 (3)	0,26	10,41
9	0 (40)	0 (70)	0 (2)	0,16	7,62
10	0 (40)	0 (70)	0 (2)	0,16	6,95
11	0 (40)	0 (70)	0 (2)	0,31	6,98

As Tabelas 10 e 11 abaixo representam a ANOVA e o teste F (Probabilidade de Fisher) para cada modelo.

Tabela 10. Análise de variância para a resposta AR no pré-tratamento alcalino.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F calculado/ F tabelado
Regressão	17,21095	6	2,868492	2,28	
Resíduo	5,03044	4	1,25761	F tabelado	0,37
Total	22,24139	10	-	6,16	

Tabela 11. Análise de variância para a resposta LS no pré-tratamento alcalino.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F calculado/ F tabelado
Regressão	31,7438	6	5,290633	12,39	
Resíduo	1,70707	4	0,426767	F tabelado	2,01
Total	33,45087	10	-	6,16	

Pode-se perceber que o modelo da variável de resposta AR não é estatisticamente significativo, uma vez que o valor do F calculado (2,28) foi menor que o F tabelado (6,16). O modelo para LS, por sua vez, é estatisticamente significativo onde o valor do F calculado foi maior que o tabelado. O modelo codificado, que representa a resposta para LS, está representado pela Equação 17:

$$LS = 6,64 + 0,68t + 1,38T + 1,18CR + 0,125(t.T) + 0,43(t.CR) + 0,007(T.CR) \quad (17)$$

Analisando os diagramas de Pareto (Figuras 14 e 15) para cada resposta, verificou-se que apenas o fator temperatura apresentou significância ($p < 0,05$) para o teor de AR, enquanto que, para o teor de LS, os três fatores foram estatisticamente significativos. Em ordem de grandeza, porém, o tempo exerce menor influência que a temperatura e concentração. Os coeficientes de correlação foram de 0,77 para AR e 0,95 para LS.

Figura 14. Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis tempo, temperatura e concentração de NaOH no teor de AR.

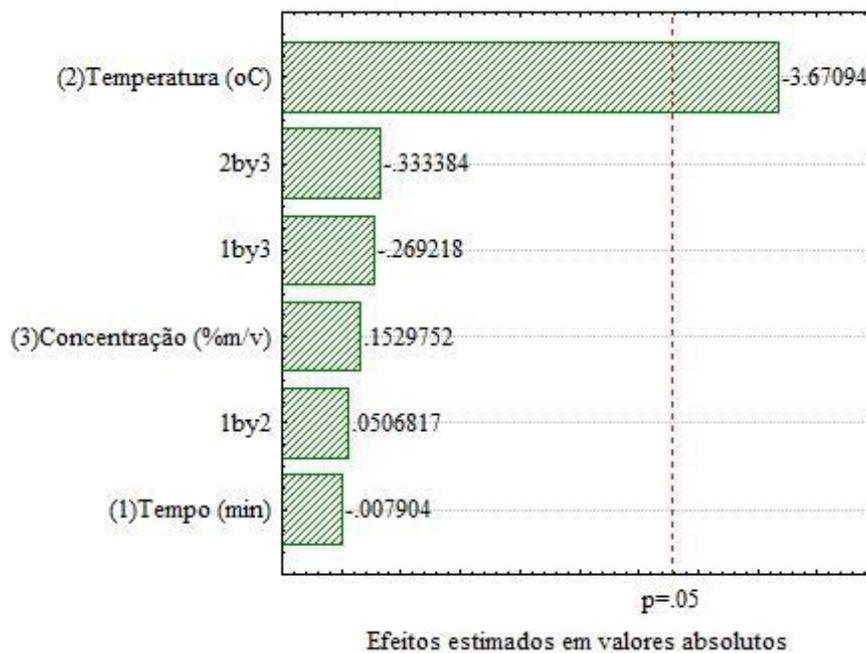
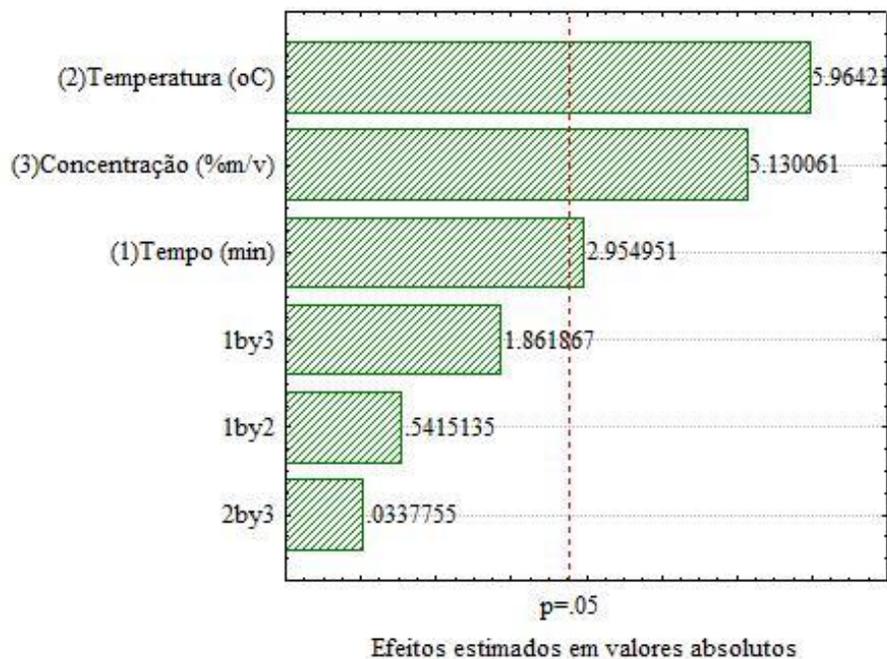
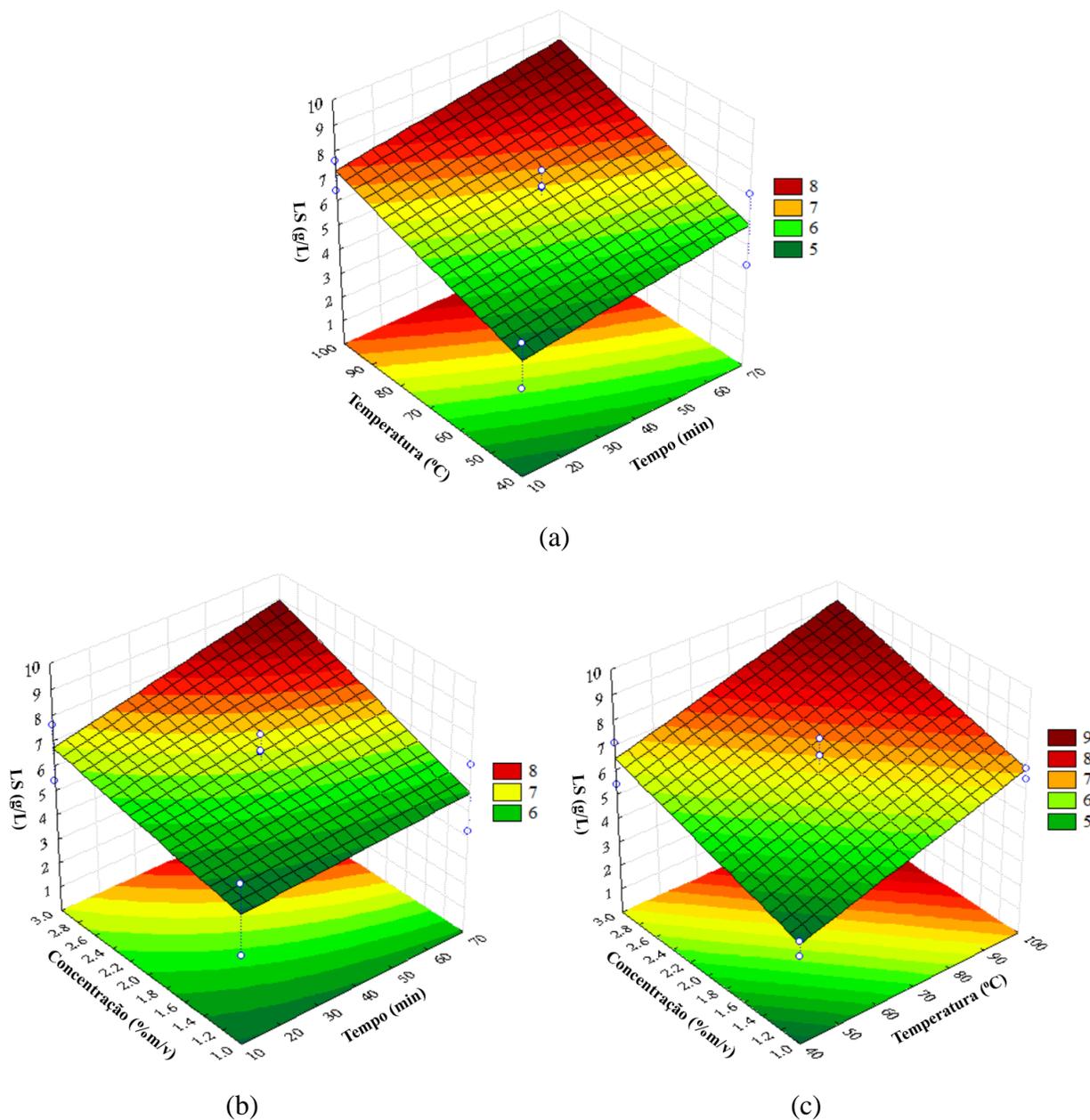


Figura 15. Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis tempo, temperatura e concentração de NaOH no teor de LS.



Os gráficos das superfícies de resposta obtidos para a variável de resposta LS estão mostrados na Figura 16. Para a superfície de resposta em função do tempo e temperatura, fixou-se a concentração de reagente no valor do ponto central (2%). Para as demais figuras, o procedimento usado foi o mesmo, sempre fixando no ponto central a variável que não estava sendo avaliada.

Figura 16. Superfícies de resposta para o teor de LS em função do tempo e temperatura (a), do tempo e da concentração (b) e da temperatura e da concentração (c) no pré-tratamento alcalino.



A análise da superfície de resposta da Figura 16a permite observar que a região com a maior teor de LS está localizada nos pontos nos quais a temperatura está acima de 100 °C e o tempo de reação acima de 70 min, ou seja, o teor de LS é diretamente proporcional ao aumento desses dois fatores. As Figuras 16b e c mostram que o aumento da concentração de NaOH também contribui para o aumento do teor de LS, corroboram a equação do modelo encontrada anteriormente, onde os três fatores foram estatisticamente significativos.

Levando em consideração os resultados encontrados e que um dos objetivos principais da hidrólise alcalina é a dissolução da lignina, o melhor resultado obtido foi o do experimento 8, com 0,26 g/L de AR e 10,41 g/L de LS. Desta forma, a condição escolhida para o pré-tratamento alcalino do sabugo de milho foi: temperatura de 100 °C, tempo de reação de 70 min e concentração de NaOH de 3%.

O rendimento obtido para esse pré-tratamento foi de 32,91% e o mesmo condiz com a literatura, pois esse tipo de pré-tratamento gera uma maior quantidade de materiais solúveis do que os outros dois métodos (ZHANG et al., 2015). O rendimento encontrado por Boonsombuti, Luengnaruemitchai e Wongkasemjit (2013) foi de 38,75% para o pré-tratamento da mesma biomassa nas condições de 30 min, 100 °C e concentração de 3%, evidenciando, assim, que existe uma influência significativa da variável tempo.

Sartori et al. (2015) obtiveram um rendimento de 50% quando pré-trataram o sabugo de milho nas condições de 121 °C, 60 min e concentração de NaOH de 1%. Esse valor de rendimento indica que, provavelmente, menos lignina e hemicelulose foram solubilizadas na fase líquida. Isso pode ser justificado por um tempo inferior e uma menor concentração de NaOH.

Analisando outras biomassas lignocelulósicas, Nascimento (2011) obteve um rendimento em massa de, aproximadamente, 50%, para o pré-tratamento químico do bagaço de cana com NaOH na proporção de 4%, a 121 °C por 60 min. Isso evidencia que o tempo de reação é uma variável significativa, já que um aumento de 10 min no pré-tratamento realizado neste trabalho promoveu uma maior solubilização dos componentes macromoleculares na fase líquida.

Com relação aos teores de AR, o pré-tratamento com NaOH liberou pouca quantidade de açúcares e resultados semelhantes foram obtidos por Baadhe, Potumarthi e Mekala (2014).

4.2.2.3. Pré-tratamento hidrotérmico

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos para o planejamento fatorial experimental 2² do pré-tratamento hidrotérmico.

Tabela 12. Resultados do planejamento experimental 2² para o pré-tratamento hidrotérmico.

Experimento	t (min)	T (°C)	AR (g/L)	LS (g/L)
1	-1 (10)	-1 (40)	1,58	2,24
2	+1 (70)	-1 (40)	1,04	2,44
3	-1 (10)	+1 (100)	1,67	2,39
4	+1 (70)	+1 (100)	2,68	2,48
5	0 (40)	0 (70)	1,91	2,33
6	0 (40)	0 (70)	1,68	2,31
7	0 (40)	0 (70)	1,99	2,43

As Tabelas 13 e 14 abaixo representam a ANOVA e o teste F para cada modelo.

Tabela 13. Análise de variância para a resposta AR no pré-tratamento hidrotérmico.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F calculado/ F tabelado
Regressão	1,416048	3	0,472016	18,30	
Resíduo	0,077391	3	0,025797	F tabelado	1,97
Total	1,493439	6	-	9,28	

Tabela 14. Análise de variância para a resposta LS no pré-tratamento hidrotérmico.

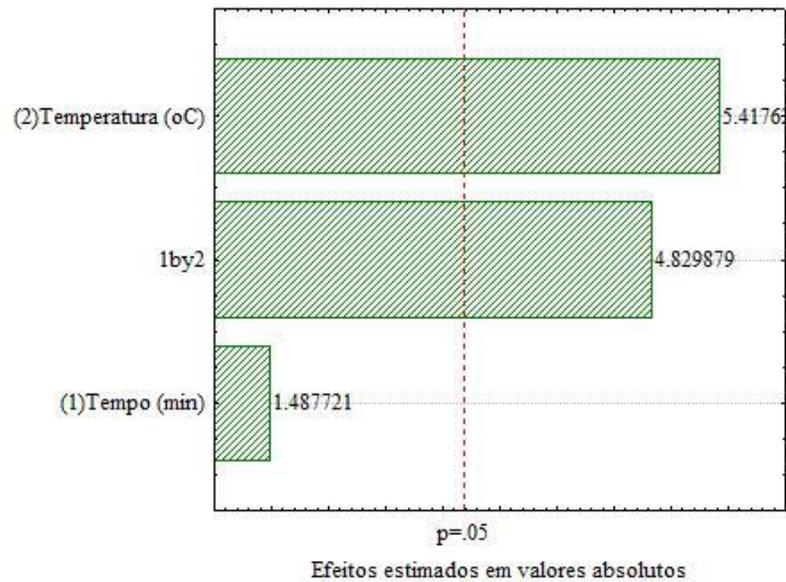
Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F calculado/ F tabelado
Regressão	0,033584	3	0,011195	3,62	
Resíduo	0,009285	3	0,003095	F tabelado	0,39
Total	0,042869	6	-	9,28	

Percebe-se que o modelo da variável de resposta AR é estatisticamente significativo, uma vez que o valor do F (18,3) foi maior que o F tabelado (9,28). O modelo para LS, entretanto, não

foi estatisticamente significativo, pois o valor do F calculado foi menor que o tabelado. Analisando o diagrama de Pareto (Figura 17) para a resposta AR, verificou-se que apenas o fator temperatura apresentou significância ($p < 0,05$). O coeficiente de correlação para esta variável foi de 0,95. O modelo codificado está representado pela Equação 18:

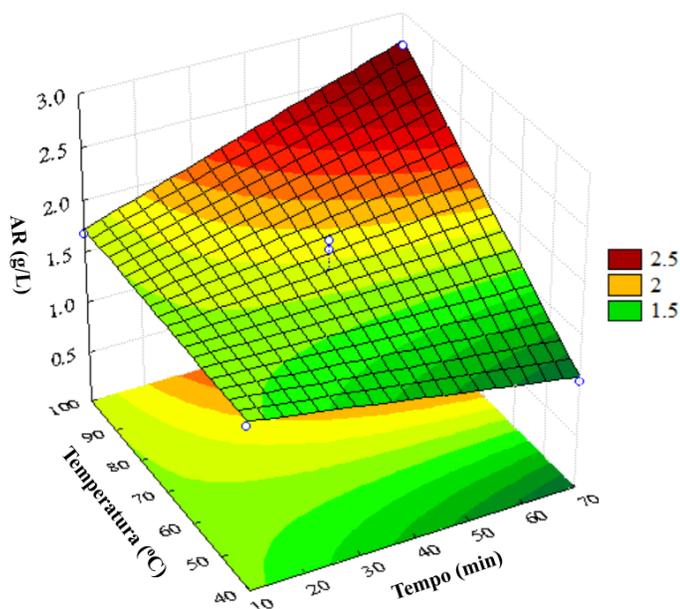
$$AR = 1,79 + 0,12t + 0,43T + 0,39(t.T) \quad (18)$$

Figura 17. Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis tempo e temperatura no teor de AR.



Como, para a resposta LS, nenhuma variável foi significativa, o Diagrama de Pareto não se fez necessário ser mostrado. O gráfico da superfície de resposta obtido para a variável de resposta AR está mostrado na Figura 18.

Figura 18. Superfície de resposta para o teor de AR em função do tempo e temperatura no pré-tratamento hidrotérmico.

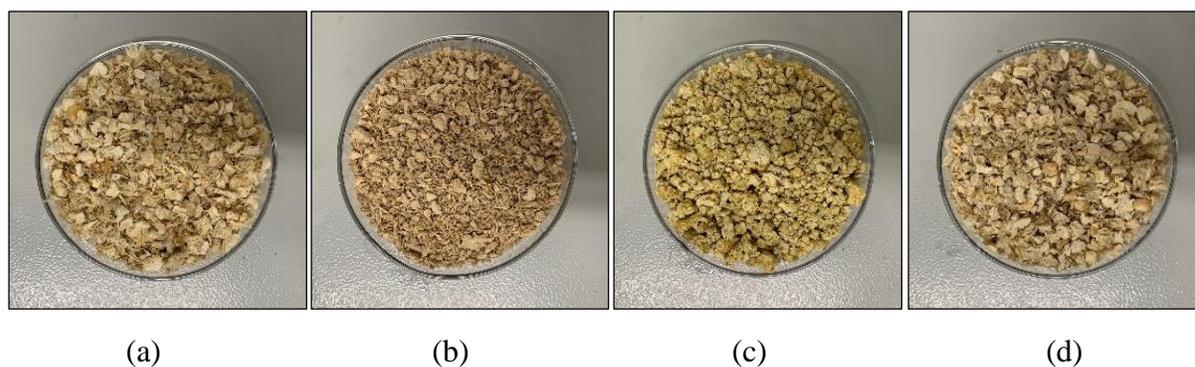


A análise da superfície de resposta da Figura 18 permite observar que a região com a maior teor de AR está localizada no ponto na qual a temperatura está acima de 100 °C, ou seja, o teor de AR é diretamente proporcional ao aumento desse fator. Entretanto, é possível perceber, analisando a Tabela 12 que os resultados para AR não diferem muito entre si, logo, é interessante utilizar menores temperaturas para redução de custos. Por este motivo, a condição escolhida para o pré-tratamento hidrotérmico do sabugo de milho, a fim de utilizá-lo na etapa de hidrólise enzimática, foi: temperatura de 40 °C, tempo de reação de 10 min. O rendimento em massa encontrado foi de 89,47% e, embora seja um valor alto, demonstra que poucas quantidades de lignina e hemicelulose foram solubilizadas na fração líquida.

Por mais que a temperatura tenha sido uma variável significativa, os teores de AR encontrados (Tabela 12) foram baixos. Toscan (2013), Costa (2015) e Souza (2016) utilizaram temperaturas altas, entre 170 e 220 °C a fim de obterem valores expressivos de ART ou diminuição da fração hemicelulósica. Deng et al. (2015) pré-trataram o sabugo em faixas de temperatura e tempo de 170-190 °C e 0-60 min, respectivamente, e só obtiveram os melhores resultados quando utilizaram os maiores valores dessas duas variáveis. Os resultados encontrados por Yu et al. (2017) também foram melhores utilizando temperaturas elevadas (180 °C). Altas temperaturas são responsáveis por acelerar a hidrólise da hemicelulose e liberar xilose.

Analisando outras biomassas lignocelulósicas, Timung et al. (2015) obtiveram os maiores teores de ART quando utilizaram a temperatura de 150 °C para pré-tratar o bagaço de cana-de-açúcar hidrotermicamente. Isso confirma que os níveis escolhidos para as variáveis de entrada não foram os ideais. Por meio da Figura 19, é possível comparar os diferentes tipos de pré-tratamento do sabugo de milho.

Figura 19. Sabugo de milho (a), pré-tratado com H_2SO_4 (b), pré-tratado com NaOH (c) e pré-tratado hidrotermicamente (d).



O pré-tratamento com H_2SO_4 promoveu um escurecimento do sabugo de milho; já o NaOH fez com o que sabugo adquirisse um coloração amarelada; o hidrotérmico, por sua vez, não causou alterações visíveis na coloração do sabugo. Os três tipos de sabugo de milho pré-tratados nas condições ácida, alcalina e hidrotérmica escolhidas anteriormente foram utilizados na etapa de hidrólise enzimática, a fim de estudar a influência da redução das quantidades de hemicelulose e lignina no rendimento de glicose.

4.2.3. Caracterização lignocelulósica do sabugo pré-tratado

Após a realização do pré-tratamentos ácido, alcalino e hidrotérmico do sabugo de milho nas melhores condições obtidas por meio do planejamento experimental, uma nova caracterização foi realizada para fins de comparação com o sabugo in natura. A Tabela 15 compara a composição química dos diferentes sabugos. A análise foi realizada em triplicata e os resultados estão apresentados como média aritmética dos valores obtidos. A Tabela 16, por sua vez, apresenta a porcentagem de remoção dos três principais compostos em cada um dos pré-tratamentos realizados, que leva em consideração o rendimento mássico obtido.

Tabela 15. Comparação da composição química dos sabugos in natura e pré-tratados.

Componentes (%)	In natura	Pré-tratado com H₂SO₄ 1%	Pré-tratado com NaOH 3%	Pré-tratado com H₂O
Celulose	32,74 ± 0,01	45,23 ± 0,01	61,43 ± 0,02	30,09 ± 0,05
Hemicelulose	28,72 ± 0,79	16,96 ± 0,54	22,13 ± 1,06	29,65 ± 1,67
Lignina insolúvel	32,13 ± 1,69	22,79 ± 3,60	9,45 ± 1,81	24,74 ± 5,72
Extrativos	1,10 ± 0,32	3,97 ± 0,31	0,37 ± 0,34	2,27 ± 0,48
Cinzas	1,90 ± 0,10	0,63 ± 0,01	1,55 ± 0,14	0,63 ± 0,01
Total	96,58	89,58	94,94	87,38

A partir da Tabela 15, percebe-se que o pré-tratamento com H₂SO₄ foi capaz de solubilizar cerca de 41% da hemicelulose e 29% da lignina presentes no sabugo. O uso do reagente de caráter ácido também proporcionou um aumento de, aproximadamente, 38% no percentual de celulose do material. Lopes (2015) pré-tratou sabugo de milho com H₂SO₄ nas condições de 0,5% de concentração, 133 °C e 20 min e obteve solubilizações de 75,77% e 27,07% nos teores de hemicelulose e lignina, respectivamente. Além disso, o teor de cinzas encontrado pela autora foi de 0,52%, valor este que se encontra próximo ao do presente trabalho. Já o estudo realizado por Silva e Rezende (2015) mostrou que, nas condições de 120 °C, 40 min e concentração de reagente de 0,5%, foi possível hidrolisar cerca de 56% da hemicelulose presente numa mistura de folhas, caules e palha de milho. O teor de lignina, entretanto, subiu mais de 22%, o que não é favorável para a etapa de hidrólise enzimática.

Analisando o pré-tratamento com NaOH, os índices de solubilização da hemicelulose e da lignina alcançaram por volta de 23% e 70%, respectivamente. O alto percentual de solubilização da lignina confirma a eficiência do tratamento alcalino, cujo objetivo é a deslignificação da biomassa. A preservação da celulose também deve ser observada (aumento de 87%), uma vez que esta é a principal matéria-prima necessária para a realização da hidrólise e consequente produção de etanol de segunda geração. Costa (2015) pré-tratou o sabugo com NaOH nas condições de 55 °C, 120 min e 3% e obteve percentuais de solubilização de lignina e hemicelulose de 9,80% e 39,41%, respectivamente. O percentual de lignina solubilizado foi bem menor que o encontrado neste trabalho, o que acaba por comprovar que o uso de temperaturas mais altas ajuda a solubilizar mais lignina. Chen, Zhao e Xia (2009) obtiveram uma solubilização de 55,44% da lignina em 120 °C, 30 min e 2% de concentração de NaOH, mais uma vez provando que maiores tempos são

capazes de solubilizar mais lignina. Já Ling et al. (2017) conseguiram obter uma solubilização de 47% da lignina quando utilizaram concentrações de 2%, tempo de 60 min e temperatura de 90 °C. Apesar da variável tempo ser importante no processo, os resultados obtidos por Su et al. (2013) mostram que tempos prolongados podem não ser ideais para a solubilização da lignina. Os autores encontraram uma porcentagem de 49,7% de solubilização para 6 h de pré-tratamento.

Por sua vez, o pré-tratamento hidrotérmico não se mostrou satisfatório. Por mais que tenha havido uma solubilização de cerca de 23% da lignina, os percentuais de hemicelulose e celulose permaneceram praticamente inalterados, mostrando que, nas condições especificadas, o pré-tratamento pode vir a ser considerado ineficiente. Silva e Rezende (2015), nas condições de 120 °C e 40 min, também obtiveram resultados semelhantes, onde os percentuais de celulose, hemicelulose e lignina permaneceram os mesmos (aumento ou diminuição de menos de 10%) e o percentual de cinzas foi de 0,53%.

Tabela 16. Porcentagem de remoção dos componentes celulose, hemicelulose e lignina para os diferentes pré-tratamentos.

Pré-tratamento	Rendimento mássico (%)	Porcentagem de remoção (%)		
		Celulose	Hemicelulose	Lignina
H₂SO₄ 1%^a	50,55	30,17	70,16	64,15
NaOH 3%^b	32,91	38,24	74,64	90,32
Hidrotérmico^c	89,47	17,78	7,62	31,12

^a: t = 70 min, T = 100 °C, CR = 1%; ^b: 70 min, T = 100 °C, CR = 3%; ^c = 10 min, T = 40 °C.

A Tabela 15 mostra que houve uma quantidade considerável de remoção de lignina (90,32%) e de hemicelulose (74,64%) durante o pré-tratamento alcalino. No entanto, a severidade desse pré-tratamento também causou perda considerável da fração celulósica (38,24%) e isso pode vir a afetar etapas futuras, como a hidrólise enzimática. O pré-tratamento ácido também demonstrou perda de celulose (30,17%) bem como remoção da hemicelulose (70,16%). Esses resultados demonstram que as escolhas dos níveis das variáveis na etapa de pré-tratamento devem ser feitas com bastante cuidado, pois não há dúvidas que altas concentrações de reagente e altas temperaturas removerão os compostos indesejados – principalmente a lignina – mas também poderão levar consigo altas porcentagens de celulose, que é o composto mais importante do processo e que deve ser preservado.

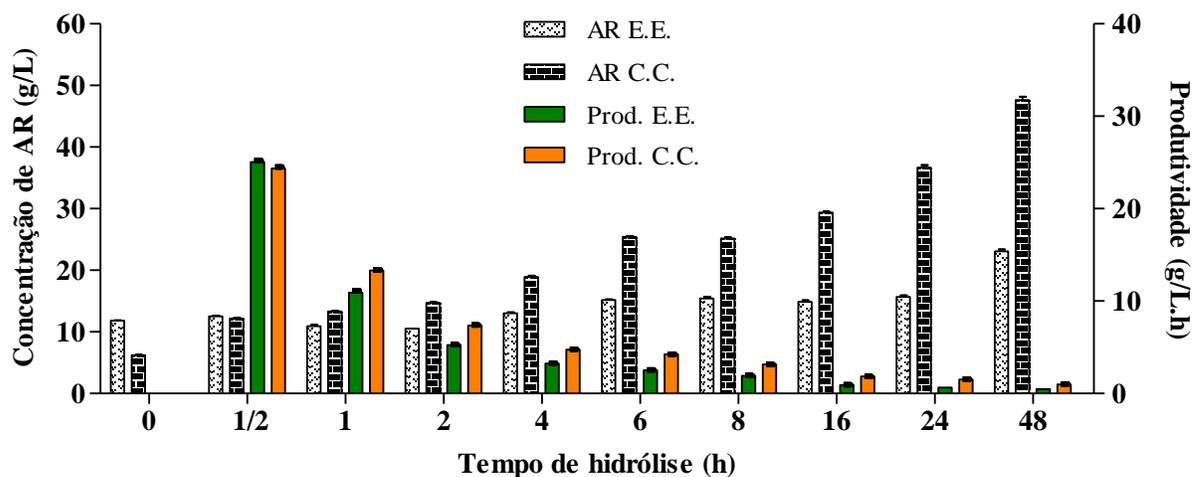
Os resultados encontrados neste trabalho apontam o pré-tratamento alcalino como sendo o mais eficiente na remoção da lignina, mas com um rendimento baixo. Em termos de concentração final de lignina, o ácido e o hidrotérmico são semelhantes, removendo poucas quantidades desse composto. É provável que o tratamento alcalino, em condições mais brandas, continue eficiente em termos de remoção de lignina sem afetar tanto o rendimento final. A equação descodificada para a variável LS no pré-tratamento com NaOH está na equação 19:

$$\begin{aligned} LS = & 1,72 - 6,44t' - 0,0645T' + 0,59CR' + \\ & 1,39(t' + T') + 0,014(t' + CR') + 2,33(T' + CR') \end{aligned} \quad (19)$$

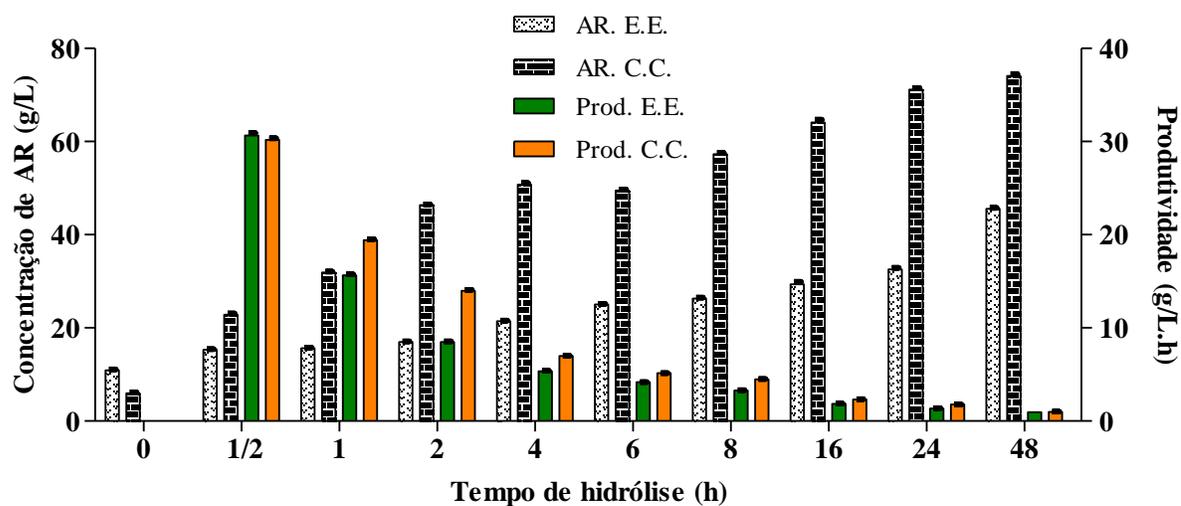
4.3. Hidrólise enzimática do sabugo de milho

A etapa de liofilização do extrato enzimático bruto de *Penicillium* sp. FSDE15 promoveu um aumento de 21 vezes na concentração enzimática em termos de quantificação de FPase, passando de 0,048 para 1,008 FPU/mL. A Figura 20 (a, b e c) relaciona os teores de AR, em g/L, liberados durante as 48 h de hidrólise enzimática realizada com sabugo de milho pré-tratado nas três diferentes condições, utilizando o extrato enzimático produzido por *Penicillium* sp. FSDE15 e a enzima comercial Celluclast® como fonte de celulasas. Além disso, a Figura 20 também relaciona a produtividade, em g/L.h, ao longo das 48 h.

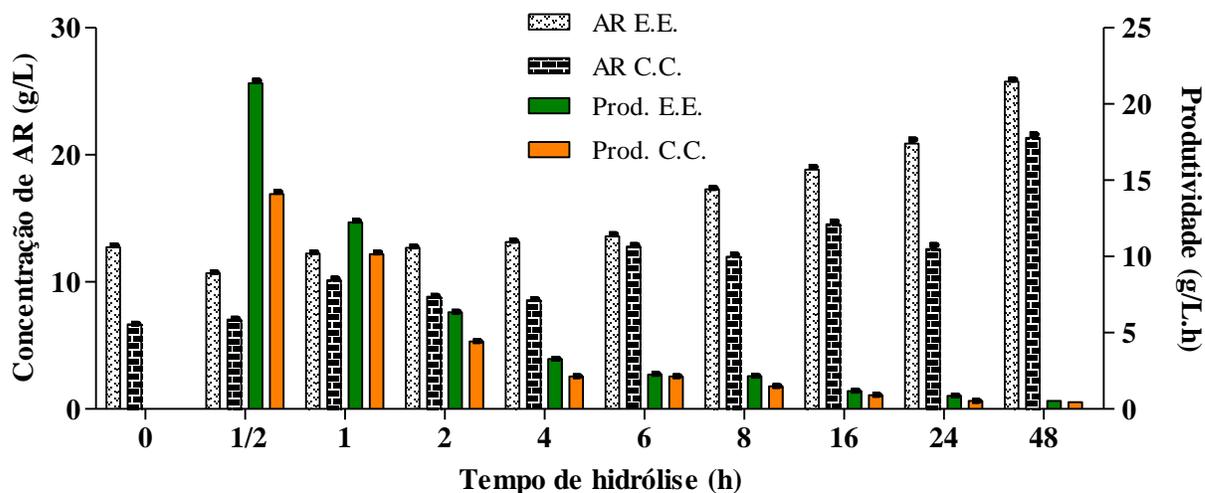
Figura 20. Teores de AR, g/L e produtividade (g/L.h) para as hidrólises enzimáticas realizadas com sabugo de milho pré-tratado com H_2SO_4 (a), sabugo de milho pré-tratado com NaOH (b) e sabugo de milho pré-tratado hidrotermicamente (c). Os dados estão representados pelas médias \pm desvios-padrão. E.E.: extrato enzimático de *Penicillium* sp. FSDE15; C.C.: enzima Celluclast®.



(a)



(b)



(c)

Analisando a Figura 20a, percebe-se que as maiores concentrações de AR foram alcançadas no tempo de 48 h, sendo $23,07 \pm 0,30$ g/L para a hidrólise com o extrato enzimático de *Penicillium* sp. FSDE15 e $47,62 \pm 0,52$ g/L de solução para a hidrólise utilizando a enzima comercial Celluclast®. Na Figura 20b, por sua vez, os melhores resultados para as hidrólises utilizando o extrato enzimático e a Celluclast® foram de $45,55 \pm 0,24$ g/L e $74,12 \pm 0,38$ g/L, respectivamente, ambas em 48 h. Já na Figura 20c, os melhores resultados também foram obtidos em 48 h, sendo $25,77 \pm 0,15$ g/L para a hidrólise com o extrato enzimático e $21,34 \pm 0,28$ g/L para a enzima Celluclast®.

A produtividade de todas as hidrólises enzimáticas atingiu o seu valor máximo em 30 min. Para a hidrólise com o sabugo pré-tratado com H_2SO_4 , as produtividades foram de $25,05 \pm 0,17$ e $24,34 \pm 0,18$ g/L.h para os ensaios com o extrato enzimático e com a Celluclast®, respectivamente. Analisando a hidrólise com o sabugo pré-tratado com NaOH, foi possível atingir, para as hidrólises com o extrato de *Penicillium* sp. FSDE15 e Celluclast®, respectivamente, valores de $30,64 \pm 0,28$ e $30,18 \pm 0,16$ g/L.h. Por fim, a hidrólise com o sabugo pré-tratado hidrotermicamente alcançou valores de $21,37 \pm 0,17$ g/L.h utilizando o extrato enzimático e $14,09 \pm 0,14$ g/L.h utilizando a enzima comercial.

Nos ensaios com os sabugos pré-tratados com H_2SO_4 e NaOH, percebe-se que a enzima comercial desempenhou um melhor papel na hidrólise da celulose e hemicelulose presentes no sabugo de milho pré-tratado. Já na hidrólise com sabugo pré-tratado hidrotermicamente, foi possível obter maiores teores de AR com o extrato enzimático produzido por *Penicillium* sp.

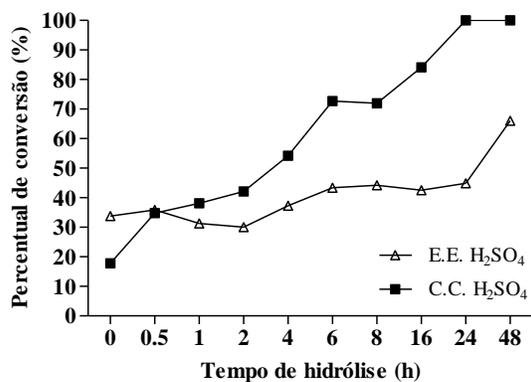
FSDE15. Isso evidencia que, para este pré-tratamento, o extrato produzido em laboratório foi mais eficiente que a enzima comercial e que o extrato pode ter diversas outras enzimas além da celulase e que não foram quantificadas (xilanases, peroxidases e enzimas lignolíticas), mas que podem vir a contribuir para uma hidrólise mais completa. Já a enzima comercial Celluclast® é composta apenas de celulase.

Também é importante citar que o pré-tratamento hidrotérmico foi realizado em condições mais brandas de temperatura, significando menor custo energético, e sem uso de reagentes, o que acaba por diminuir consideravelmente o custo geral do processo. Além disso, em pré-tratamentos alcalinos e ácidos, a etapa de lavagem da biomassa recém pré-tratada com água destilada é imprescindível, de modo que seu pH seja neutralizado e a biomassa possa ser utilizada em hidrólises. Entretanto, essa etapa não é necessária para o pré-tratamento hidrotérmico, significando economia de água.

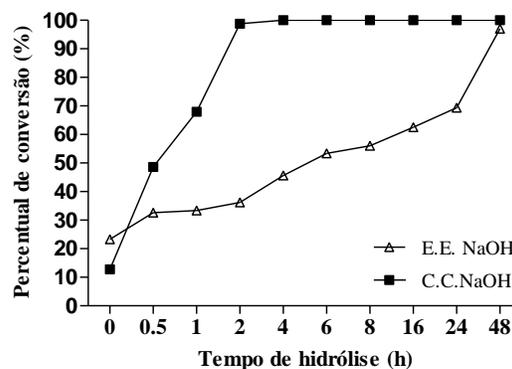
Alguns fatores podem ter promovido teores mais baixos de AR nas hidrólises realizadas com extrato enzimático oriundo de *Penicillium* sp. FSDE15. O pH pode ter variado consideravelmente, ficando fora da faixa de trabalho requerida pela enzima celulase. Além disso, o próprio extrato enzimático pode ter sido contaminado e sofrido inibição por substâncias geradas durante o pré-tratamento do sabugo ou por substâncias geradas durante a hidrólise. Um outro fator importante que pode ter contribuído para esses resultados é a “idade” do extrato enzimático. Devido à pandemia de 2020 e ao fechamento dos laboratórios, o extrato utilizado neste trabalho permaneceu cerca de 14 meses congelado para finalmente ser utilizado. Por mais que o processo de congelamento de extratos seja amplamente utilizado em pesquisas, é necessário levar em conta a possibilidade de alteração das propriedades químicas dependendo do tempo em que o extrato permaneceu congelado.

A Figura 21 (a, b e c) exhibe o percentual de conversão de celulose e hemicelulose em glicose, considerando que o rendimento teórico máximo de glicose na hidrólise é de 50 g/L, pois a porcentagem de sabugo no volume de 50 mL de hidrólise foi de 5 %. Por meio de um balanço de massa, os rendimentos teóricos máximos para as hidrólises realizadas com sabugo pré-tratado H₂SO₄, NaOH e hidrotérmicamente foram de 31,09, 41,78 e 29,87 g/L, respectivamente.

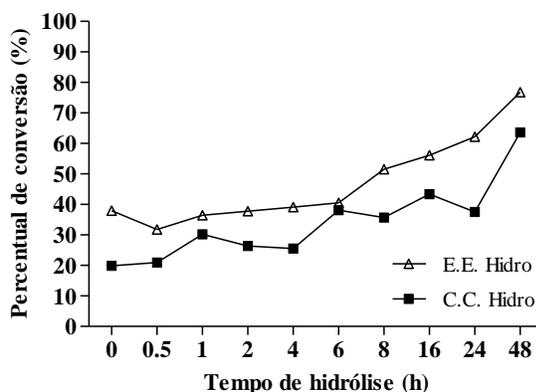
Figura 21. Percentual de conversão de celulose e hemicelulose em glicose para as hidrólises realizadas com sabugo pré-tratado com H₂SO₄ (a), sabugo pré-tratado com NaOH (b) e sabugo pré-tratado hidrotermicamente (c).



(a)



(b)



(c)

A Figura 21a mostra que a hidrólise enzimática utilizando o extrato enzimático de *Penicillium* sp. FSDE15 atingiu um percentual de conversão de 66,03% ao final das 48 h, enquanto que a hidrólise com a enzima Celluclast® atingiu uma conversão máxima em 24 h. Na Figura 21b, a hidrólise com o extrato enzimático atingiu, em 48h, o valor de 97,04 % e a enzima comercial atingiu o valor de 100 % em 4 h. Os resultados para a hidrólise do sabugo pré-tratado com NaOH com extrato de *Penicillium* sp. FSDE15 se mostraram promissores e, com mais algumas horas de hidrólise, seria possível atingir 100% de conversão. Já na Figura 21c, percebe-se que a conversão máxima atingida pela hidrólise com o extrato enzimático foi de 76,79% e para a hidrólise com a enzima Celluclast®, esse valor foi de 63,58%. Isso é um ponto muito positivo, principalmente ao se pensar no custo de aquisição das enzimas, uma vez o custo de obtenção do coquetel enzimático de *Penicillium* sp. FSDE15 é menor que o da enzima comercial Celluclast®.

Chen, Zhao e Xia (2009) realizaram hidrólise enzimática da palha do milho utilizando porcentagem do substrato de 8%, 100 mL de volume reacional, carga enzimática de 20 FPU/g de celulase koji de *Trichoderma reesei* (quantificada como 146 unidades de papel de filtro) e mesmas condições de temperatura, rotação e tempo de hidrólise. Eles obtiveram percentuais de conversão de 81,2% para a palha pré-tratada com NaOH 2% (120 °C e 30 min) e 39,4% para a palha pré-tratada com H₂SO₄ 1,5% (108 °C e 6 h). Uma provável justificativa para os percentuais de conversão baixos está no teor de remoção de lignina que os autores obtiveram, que foi de 73,9% para o pré-tratamento alcalino e 12,2% para o pré-tratamento ácido e ambos foram menores do que os obtidos no presente trabalho. Isso vem a provar que a remoção da lignina desempenha um papel crucial no aumento da digestibilidade enzimática do substrato.

4.4. Aumento de escala para a produção de bioetanol

A proposta deste tópico é realizar um balanço de massa para quantificar a glicose e o bioetanol que poderão ser obtidos a partir de 1 tonelada de biomassa in natura e levando em consideração cada um dos três tipos de sabugo de milho pré-tratados anteriormente e seus rendimentos mássicos. Como pôde ser observado na Figura 20, os maiores teores de AR nas hidrólises enzimáticas utilizando o extrato de *Penicillium* sp. FSDE15 foram obtidos em 48 h para todos os três tipos de sabugo pré-tratado. Logo, estes serão os teores a serem utilizados no aumento de escala. A Tabela 17 relaciona os balanços de massa para os diferentes tipos de sabugo.

Tabela 17. Balanço de massa utilizando os três tipos de sabugo pré-tratado para 1 tonelada de biomassa inicial.

Balanço de massa	Rendimento mássico (%)	Sabugo pré-tratado (kg)	g _{glicose} /g _{sabugo}	Glicose (kg)	Bioetanol (kg)	Bioetanol (L)
1*	32,91	329,1	0,911	299,8	153,2	194,2
2**	50,55	505,5	0,474	239,6	122,4	155,2
3***	89,47	894,7	0,515	460,7	235,4	298,4

*: sabugo pré-tratado com NaOH, AR = 45,55 g/L; **: sabugo pré-tratado com H₂SO₄, AR = 23,70 g/L; ***: sabugo pré-tratado hidrotermicamente, AR = 25,77 g/L.

As seguintes afirmações foram levadas em consideração para os cálculos: os açúcares redutores eram compostos puramente por glicose; o rendimento da fermentação é 100%; o

rendimento teórico de etanol por g de glicose consumida é de 0,511. Pela tabela, é possível observar que nem sempre o pré-tratamento alcalino (1*), já muito conhecido na literatura por promover a remoção da lignina, é o ideal, pois condições severas de temperatura e tempo podem diminuir drasticamente o rendimento mássico. Além disso, a tabela demonstra que, apesar da relação $\frac{g_{\text{glicose}}}{g_{\text{sabugo}}}$ do balanço de massa 3*** (sabugo pré-tratado hidrotermicamente) ser baixa, o rendimento mássico da etapa de pré-tratamento é o mais elevado entre os três, levando a uma maior produção de bioetanol ao fim do processo e reforçando que esse tipo de pré-tratamento pode vir a ser utilizado com mais frequência no futuro.

5. CONCLUSÕES

O meio de cultivo contendo farelo de trigo com sabugo de milho melhorou a produção de celulasas pelo fungo *Penicillium* sp. FSDE15, sendo os valores de atividade enzimática encontrados maiores na mistura do que nos ensaios realizados com os substratos isolados.

A etapa de pré-tratamento é de grande importância e verificou-se que a utilização de concentração de 3%, temperatura de 100 °C e tempo de contato de 70 min foi a melhor condição para o reagente NaOH, com maior redução no teor de lignina entre os três pré-tratamentos. Para o reagente H₂SO₄, teve-se como melhor condição, temperatura de 100 °C, tempo de reação de 70 min e concentração de 1%, com aumento na concentração de AR liberados, mas redução no teor de lignina semelhante ao tratamento hidrotérmico. Apesar de ser melhor na redução de lignina, o tratamento com NaOH teve menor rendimento em biomassa, sendo elevada a perda de massa ao longo do processo.

No que diz respeito à hidrólise enzimática dos sabugos pré-tratados com NaOH e H₂SO₄, os resultados ficaram abaixo do esperado. Isso demonstra que o período em que o extrato enzimático é mantido congelado pode vir a ser um importante fator que contribui negativamente para a estabilidade das enzimas celulolíticas e, conseqüentemente, para a hidrólise da celulose e hemicelulose. Os resultados para a hidrólise do sabugo pré-tratado hidrotermicamente foram melhores para o extrato enzimático de *Penicillium* sp. FSDE15 quando comparado à enzima comercial Celluclast®. Isso demonstra que o extrato pode vir a ter outras enzimas além da celulase, que contribuiriam para a hidrólise da biomassa.

No futuro, mais estudos devem ser realizados de modo a avaliar a estabilidade das enzimas ao longo do tempo. O fungo filamentosso *Penicillium* sp. FSDE15 já demonstrou ser um bom produtor de celulasas; por isso, faz-se necessário realizar novas hidrólises, a partir de extratos enzimáticos recentes, visando compreender de forma mais robusta a ação dessas enzimas, e poder torná-las competitivas frente as enzimas comerciais existentes no mercado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOAGYE, D. et al. **Glucose recovery from different corn stover fractions using dilute acid and alkaline pretreatment techniques.** Journal of Ecology and Environment, v. 41, 2017.
- ALEIXO JÚNIOR, M. E. **Produção e caracterização de enzimas produzidas por *Penicillium* sp. FSDE15 usando bagaço de malte.** 2018. 630. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2018.
- ALGAR, I. et al. **Pineapple Agroindustrial Residues for the Production of High Value Bacterial Cellulose with Different Morphologies.** J. Appl. Polym. Sci., v. 132, 2014.
- ALIYAH, A. et al. **Production of α -amylase and β -glucosidase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method on biomass waste residues from rice husk, bagasse and corn cob.** Energy Procedia, v. 136, p. 418-423, 2017.
- ALSHEIKH-HUSSAIN, A.; ALTENAIJI, E. M.; YOUSEF, L. F. **Fungal cellulases from mangrove forests – a short review.** J. Biochem Tech, v. 5, p. 765-774, 2013.
- AMIN, F. R. et al. **Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion.** AMB Express 7:72, 2017.
- AMORIM, C. C. **Liquefação de farelo de trigo para produção de xilanases por cultivo submerso de *Aspergillus niger*.** 2017. 67f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, 2017.
- ARAÚJO, F. H. O. et al. **Avaliação da aplicabilidade de farinha de sabugo de milho no enriquecimento de produtos alimentícios.** Nutrição Brasil, v. 15, 2016.
- ASGHER, M. KHAN, S. W. BILAL, M. **Optimization of Lignocellulolytic Enzyme Production by *Pleurotus eryngii* WC 888 utilizing Agro-Industrial Residues and Bio-ethanol Production.** Romanian Biotechnological Letters, v. 21, 2016.
- ASSIS, T. R. **Obtenção de enzimas lignolíticas visando a hidrólise enzimática da fração lignocelulósica de bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente.** 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- AYALA, O. L. B. **Avaliação de pré-tratamentos para a hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar considerando a produção de etanol.** 2012. 173 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2012.
- BAADHE, R. R.; POTUMARTHI, R.; MEKALA, N. K. **Influence of dilute acid and alkali pretreatment on reducing sugar production from corncobs by crude enzymatic method: A comparative study.** Bioresource Technology, v. 162, p. 213-217, 2014.

BAETHGEN, W. E.; ALLEY, M. M. **A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digest.** Soil Science Plant Analysis, North Carolina, v. 20, p.961-969, 1989.

BARROS, J. F. C.; CALADO, J. G. **A cultura do milho.** Universidade de Évora, Évora, Portugal, 2014.

BELLETATO, R. 2019. **Cresce expectativa de produção do etanol celulósico no país.** Acessado em: 19/01/21. URL: <https://blog.chbagro.com.br/cresce-expectativa-de-producao-do-etanol-celulosico-no-pais>.

BHUTTO, A. W. et al. **Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass.** Energy, v. 122, p. 724-745, 2017.

BISPO, M. D. et al. **Pyrolysis of Agroindustrial Residues of Coffee, Sugarcane Straw and Coconut-Fibers in a Semi-pilot Plant for Production of Bio-oils: Gas Chromatographic Characterization.** Journal of Earth Science and Engineering v. 6, p. 235-244, 2016.

BONFIM, K. S. et al. **Comparação da síntese de celulases pelos fungos *Trichoderma reesei* e o FSDE 15.** Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis, SC, 2015.

BOONSOMBUTI, A.; LUENGNARUEMITCHAI, A.; WONGKASEMJIT, S. **Enhancement of enzymatic hydrolysis of corncob by microwave-assisted alkali pretreatment and its effect in morphology.** Cellulose, v. 20, p. 1957–1966, 2013.

CARDOSO, A. L. C.; SANTOS, F. A.; SANTOS, S. F. M. **Produção de celulases por *Aspergillus* sp. FSDE16 utilizando farelo de trigo como substrato: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio.** Anais do IV Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências, v. 1, 2019.

CARVALHO, M. L. **Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar.** 2011. 103f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2011.

CARVALHO-GONÇALVES, L. C. T. **Bioprospecção de fungos celulolíticos provenientes da agroindústria para produção de bioetanol.** 2017. 199p. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2017.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. **Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais.** Química Nova, v. 33, p. 181-188, 2009.

CERDA, A. et al. **Towards a competitive solid state fermentation: Cellulases production from coffee husk by sequential batch operation and role of microbial diversity.** Science of the Total Environment, v. 589, p. 56–65, 2017.

CHEN, M.; ZHAO, J.; XIA, L. **Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility.** Biomass and Bioenergy, v. 33, p. 1381-1385, 2009.

- CIANCHETTA, S. et al. **Evaluation of Selected White-Rot Fungal Isolates for Improving the Sugar Yield from Wheat Straw.** Appl Biochem Biotechnol, v. 173, p. 609–623, 2014.
- CINELLI, B. A. et al. **Granular starch hydrolysis of babassu agroindustrial residue: A bioprocess within the context of biorefinery.** Fuel 124, p. 41–48, 2014.
- COLLA, L. M. et al. **Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus* through Solid-State and Submerged Fermentation.** BioMed Research International, 2015.
- CONAB, 2018. **A Cultura do Milho: análise dos custos de produção e da rentabilidade nos anos-safra 2007 a 2017.** Brasília – DF, v. 14, 2018.
- CONAB, 2019. **Análise mensal - Milho.** Maio/Junho 2019, Brasília - DF, 2019.
- CONAB, 2021. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos.** v. 8, n. 7, Safra 2020/21 - Sétimo levantamento, Brasília - DF, 2021.
- CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semissólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*.** 2004. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2004.
- COSTA, D. M. **Sabugo de milho como suporte para imobilização de lipase.** 2015. 157f. Tese (Doutorado). Universidade Tiradentes, Aracaju, SE. 2015.
- CRUZ, J. C. et al. **Milho: o produtor pergunta, a Embrapa responde.** Embrapa Informação Tecnológica, Brasília – DF, 2011.
- CYPRIANO, D. Z. **Biomassa de casca de laranja industrial como fonte de bioetanol e produtos de alto valor agregado.** 2015. 103p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2015.
- DAGNINO, E. P. et al. **Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production.** Industrial Crops and Products, v. 42, p. 363–368, 2013.
- DANTAS, V. F. S. **Potencial energético dos resíduos da cultura do milho (*Zea mays* L.) e do epicarpo do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.).** 2013. 46p. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2013.
- DENG, A. et al. **Corn cob lignocellulose for the production of furfural by hydrothermal pretreatment and heterogeneous catalytic process.** RSC Advances, v. 74, 2015.
- DICOSIMO, R. et al. **Industrial use of immobilized enzymes.** Chem. Soc. Rev., v. 42, p. 6437–6474, 2013.
- DORIYA, K. et al. **Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of L-Asparaginase.** Advances in Food and Nutrition Research, v. 78, p. 115-135, 2016.

DU, W. et al. **The promoting effect of byproducts from *Irpex lacteus* on subsequent enzymatic hydrolysis of bio-pretreated cornstalks.** *Biotechnology for Biofuels* 4:37, 2011.

DUQUE, S. H.; CARDONA, C. A.; MONCADA, J. **Techno-Economic and Environmental Analysis of Ethanol Production from 10 Agroindustrial Residues in Colombia.** *Energy Fuels*, v. 29, p. 775-783, 2015.

FERREIRA, J. **Etanol de segunda geração: definição e perspectivas.** *Rev. Conexão Eletrônica*, v. 12, 2015.

FERREIRA, N. L. et al. **Use of Cellulases from *Trichoderma reesei* in the Twenty-First Century—Part I: Current Industrial Uses and Future Applications in the Production of Second Ethanol Generation.** *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, p. 245-261, 2014.

FERRER-PARRA, L. et al. **Partial characterization of esterases from *Fusarium culmorum* grown in media supplemented with di (2-ethyl hexyl phthalate) in solid-state and submerged fermentation.** *Mexican Journal of Biotechnology*, v. 3, p. 82-94, 2018.

GARCIA, N. F. L. et al. **Production of β -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract.** *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 18, p. 314–319, 2015.

GHOSE, T.K. **Measurement of cellulase activities.** *Pure & Appl. Chem.*, v. 59, p. 257-268, 1987.

GOLDSCHMIDT, O. **Ultraviolet Spectra.** In: Sarkanen, K.; Ludwig, C. H. (Eds). **Lignins: occurrence, formation, structure and reactions.** New York: John Wiley & Sons, p. 241-298, 1971.

GONÇALVES, F. A.; SANTOS, E. S.; MACEDO, G. R. **Use of cultivars of low cost, agroindustrial and urban waste in the production of cellulosic ethanol in Brazil: A proposal to utilization of microdistillery.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 50, p. 1287–1303, 2015.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. **Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 474-480, 2006.

GUIMARÃES, N. C. A. et al. **Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate.** *SpringerPlus*, 2:380, 2013.

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

HASUNUMA, T.; KONDO, A. **Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains.** *Process Biochemistry*, v. 47, p. 1287–1294, 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 4^a ed. São Paulo, 2008.

JECU, L. **Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production.** *Industrial Crops and Products*, v. 11, p. 1–5, 2000.

JUNG, Y. H. et al. **Dilute acid pretreatment of lignocellulose for whole slurry ethanol fermentation.** *Bioresource Technology*, v. 132, p. 109–114, 2013.

JUTURU, V.; WU, J. C. **Microbial cellulases: Engineering, production and applications.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 33, p. 188–203, 2014.

KAPILAN, R. **Solid state fermentation for microbial products: A review.** *Arch. Appl. Sci. Res.*, v. 7, p. 21-25, 2015.

KEEY, R.B. **Drying of loose and particulate materials.** New York: Hemisphere, 1991.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. **A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass.** *Bioresour Technol*, v. 199, p. 42-48, 2016.

KJELDAHL, J. A. **Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in Organischen Korpern.** *Z. Anal. Chem*, v. 22, p. 366–382, 1883.

KONZEN, E. A.; ALVARENGA, R. C. **Fertilidade de solos.** Embrapa Milho e Sorgo, versão eletrônica, 4 ed, 2008.

KUCHARSKA, K. et al. **Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes.** *Molecules*, v. 23, 2018.

KUHAR, F.; CASTIGLIA, V.; LEVIN, L. **Enhancement of laccase production and malachite green decolorization by co-culturing *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor* in solid-state fermentation.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 104, p. 238-243, 2015.

KURIAN, J. K. et al. **Feedstocks, logistics and pre-treatment processes for sustainable lignocellulosic biorefineries: A comprehensive review.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 25, p. 205–219, 2013.

LANCEFIELD, C. S. et al. **Pre-treatment of Lignocellulosic Feedstocks Using Biorenewable Alcohols: Towards Complete Biomass Valorisation.** *Green. Chem.*, 2016.

LEE, J. W. et al. **Sequential dilute acid and alkali pretreatment of corn stover: Sugar recovery efficiency and structural characterization.** *Bioresource Technology*, v. 182, p. 296–301, 2015.

LI, H. et al. **Enhanced Enzymatic Hydrolysis and Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation of Sugarcane Bagasse by Combined Diluted Acid with Oxidate Ammonolysis Pretreatment.** *Bioresour Technol*, p. 257-263, 2017.

LI, M.; PU, Y.; RAGAUSKAS, A. J. **Current Understanding of the Correlation of Lignin Structure with Biomass Recalcitrance**. *Front. Chem.*, v. 18, 2016.

LI, P. et al. **Effect of acid pretreatment on different parts of corn stalk for second generation ethanol production**. *Bioresource Technology*, v. 206, 2016.

LING, H. et al. **Corn cob Mild Alkaline Pretreatment for High 2,3-Butanediol Production by Spent Liquor Recycle Process**. *BioEnergy Research*, v. 10, p. 566–574, 2017.

LOOW, Y. et al. **Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment**. *Cellulose*, v. 23, p. 1491–1520, 2016.

LOPES, M. M. **Avaliação do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho suplementado com proteína de farelo de soja solubilizada para obtenção de bioetanol**. 2015. 106f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Lorena, SP. 2015.

LORENZI, B. R.; ANDRADE, T. H. N. **O etanol de segunda geração no Brasil: políticas e redes sociotécnicas**. *Rev. bras. Ci. Soc.* 34, 2019.

LUCARINI, A. C. et al. **Estudo comparativo do pré-tratamento por peróxido de hidrogênio seguido de hidrólise enzimática de palha de cana de açúcar e sabugo de milho**. *Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, Florianópolis, SC, 2015.

MAGALHÃES, P. C. et al. **Fisiologia do milho**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sete Lagoas, MG, dezembro, 2002.

MANPREET, S. et al. **Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation**. *Malaysian Journal of Microbiology*, v. 1, p. 1-9, 2005.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. 158 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MÉLO, B. C. A. et al. **Avaliação do resíduo agroindustrial de acerola para produção de celulases por fermentação em estado sólido**. *Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, Florianópolis, SC, 2015.

MELZER, M. et al. **Pyrolysis of extractive rich agroindustrial residues**. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 104, p 448–460, 2013.

MENG, X. et al. **Insights into the effect of dilute acid, hot water or alkaline pretreatment on the cellulose accessible surface area and the overall porosity of *Populus***. *Green Chem.*, v. 17, p. 4239-4246, 2015.

MILÉO, P. C. **Aplicações da celulose de palha de cana-de-açúcar: obtenção de derivados partindo de celulose branqueada e de biocompósitos com poliuretana obtida a partir de óleo**

de mamona (*Ricinus communis L.*). 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MILLER, G. L. **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar**. Anal. Chem., v. 31, p. 426-428, 1959.

MOHAMAD, N. R. et al. **An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes**. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2015.

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

MORAIS, A. R. C. MATA. A. C. BOGEL-LUKASIK, R. **Integrated conversion of agroindustrial residue with high pressure CO₂ within the biorefinery concept**. Green Chem., v. 16, p. 4312-4322, 2014.

MORAIS, J. P. S.; Rora, M. F.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para Análise Lignocelulósica**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010.

MORETTI, M. M. S. **Produção de ligno-hemi-celulases por fermentação em estado sólido e avaliação dos efeitos da aplicação das enzimas na composição química e estrutura do bagaço e da palha de cana**. 2013. 128 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, 2013.

MUNISWARAN, P. K. A.; CHARYULU, N. C. L. N. **Solid substrate fermentation of coconut coir pith for cellulase production**. Enzyme and Microbial Technology, v. 16, p. 436-440, 1994.

NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. 2011. 138 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2011.

NEIVA JÚNIOR, A. P. et al. **Efeito de diferentes aditivos sobre os teores de proteína bruta, extrato etéreo e digestibilidade da silagem de maracujá**. Ciênc. Agrotec., v. 31, 2007.

NITSOS, C. K.; MATIS, K. A. TRIANTAFYLLIDIS, K. S. **Optimization of Hydrothermal Pretreatment of Lignocellulosic Biomass in the Bioethanol Production Process**. ChemSusChem, v. 6, p. 110-122, 2013.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. **Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization**. Food Chemistry, v. 198, p. 119-124, 2015.

OGATA, B. H. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias**. 2013. 109f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2013.

ORTIZ, G. E. et al. **Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 44, p. 197–211, 2016.

PANDEY, A. et al. **Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse.** Bioresource Technology v. 74, p. 69-80, 2000.

PANDIYAN, K. et al. **Technological interventions for utilization of crop residues and weedy biomass for second generation bio-ethanol production.** Renewable Energy, v. 132, p. 723-741, 2019.

PAYNE, C. M. et al. **Fungal Cellulases.** Chem. Rev., v. 115, p. 1308–1448, 2015.

PECIULYTE, A. et al. **Impact of the supramolecular structure of cellulose on the efficiency of enzymatic hydrolysis.** Biotechnology for Biofuels, v. 8, 2015.

PELLERA, F.; GIDARAKOS, E. **Effect of substrate to inoculum ratio and inoculum type on the biochemical methane potential of solid agroindustrial waste.** Journal of Environmental Chemical Engineering, v. 4, p. 3217-3229, 2016.

PEREIRA, J. C. et al. **Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification.** J Appl Microbiol., v. 118, p. 928-939, 2015.

PIROTA, R. D. P. B. et al. **Bioprocess developments for cellulase production by *Aspergillus oryzae* cultivated under solid-state fermentation.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 33, p. 21-31, 2016.

PIROTA, R. D. P. B.; DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S. **Simplification of the Biomass to Ethanol Conversion Process by Using the Whole Medium of Filamentous Fungi Cultivated Under Solid-State Fermentation.** BioEnergy Research, v. 7, p. 744–752, 2014.

PITARELO, A. P. **Produção de etanol celulósico a partir de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor.** 2013. 162 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2013.

RAHNAMA, N. et al. **Effect of Alkali Pretreatment of Rice Straw on Cellulase and Xylanase Production by Local *Trichoderma harzianum* SNRS3 under Solid State Fermentation.** BioResources, v. 8, p. 2881-2896, 2013.

RAMOS-SÁNCHEZ, L. B. et al. **Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation.** J. Bioprocess Biotech, v. 4, 2015.

RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. **Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 80, p. 330–340, 2017.

ROCHA, J. C. **Produção de celulases e xilanases utilizando o *Penicillium* sp. FSDE15.** 2016. 44 f. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2016.

ROCHA, M. S. R. S. et al. **Pré-tratamento ácido de resíduos de milho para produção de etanol de segunda geração.** ENGEVISTA, v. 18, p. 412-423, 2016.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos.** 3ª edição revisada. Campinas – SP. Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.

RODRIGUES, T. H. S. et al. **The Bioconversion of Pretreated Cashew Apple Bagasse into Ethanol by SHF and SSF Processes.** Appl Biochem Biotechnol, v. 178, p. 1167-1183, 2016.

SAAD, M. B. W. **Avaliação técnica preliminar da produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** 2010. 138 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SADHU, S.; MAITI, T. K. **Cellulase Production by Bacteria: A Review.** British Microbiology Research Journal, v. 3, p. 235-258, 2013.

SAHA, B. C. et al. **Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 109, p. 29-35, 2016.

SALEHIAN, P. et al. **Improvement of biogas production from pinewood by alkali pretreatment.** Fuel, v. 106, p. 484–489, 2013.

SALES, M. R. et al. **Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de Aspergillus.** Pes. Agropec, Bras, v. 45, p. 1920-1296, 2010.

SANTOS, F. A. et al. **Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando a produção de etanol celulósico.** Química Nova, v. 37, p. 56-62, 2014.

SANTOS, F. A. et al. **Potencial da palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol.** Química Nova, v. 35, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, M. S. R. **Estudo de pré-tratamentos de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2G.** 2014. 76p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alagoas, Maceió – AL, 2014.

SANTOS, M. S. R. et al. **Avaliação do pré-tratamento ácido do sabugo de milho visando a produção de etanol 2G.** Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis, SC, 2015.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato.** 2007. 148 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.

SARTORI, T. et al. **Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Residues by Cellulases Obtained from Solid State Fermentation Using *Trichoderma viride*.** BioMed Research International, 2015.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. et al. **Importance of medium pH in solid state fermentation for growth of *Schwanniomyces castellii***. Letters in Applied Microbiology, v. 15, p. 164-167, 1992.

SCULLY, S.; ORLYGSSON, J. **Recent Advances in Second Generation Ethanol Production by Thermophilic Bacteria**. Energies, v. 8, p. 1-30, 2015.

SETHI, S. et al. **Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil**. ISRN Biotechnology. 2013.

SHARMA, H. K.; XU, C.; QIN, W. **Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview**. Waste and Biomass Valorization, v. 10, p. 235-251, 2019.

SHIMIZU, F. L. **Remoção de lignina e hemicelulose: influência na acessibilidade à celulose e sacarificação enzimática**. 2018. 76f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2018.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 123 f. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, V. F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. 113 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SILVA, M. D. **Produção de etanol de segunda geração por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 a partir da hidrólise ácida de sabugo de milho (*Zea mays* L.)**. 2018. 101f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, São Paulo, 2018.

SILVA, R. A. P.; REZENDE, C. A. **Estudo da degradação de resíduos do cultivo de milho para a produção de etanol de segunda geração**. Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Campinas, SP, 2015.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. **Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview**. Bioresource Technology, v. 199, p. 76-82, 2016.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. **Improved Cellulase Production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF Through Process Optimization**. Appl Biochem Biotechnol, v. 142, p. 60–70, 2007.

SINGHANIA, R. R. et al. **Cellulases**. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering Production, Isolation and Purification of Industrial Products, Chapter 4, p. 73-101, 2017.

SOAM, S. et al. **Global warming potential and energy analysis of second generation ethanol production from rice straw in India**. Applied Energy, v. 184, p. 353–364, 2016.

- SOCOL, C. R. et al. **Recent developments and innovations in solid state fermentation.** *Biotechnology Research and Innovation*, v. 1, p. 52-71, 2017.
- SOUSA, V. M. Z. **Desenvolvimento de novas metodologias para o pré-tratamento e hidrólise do bagaço de cana para a produção de etanol celulósico.** 2014. 57 f. Monografia. Faculdade UnB Gama, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2014.
- SOUZA, D. F.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. **Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarii* in solid-state fermentation.** *Process Biochemistry*, v. 36, p. 835–838, 2001.
- SOUZA, R. B. A. **Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar.** 2016. 124f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2016.
- SRIVASTAVA, N. et al. **Application of Cellulases in Biofuels Industries: An Overview.** *Journal of Biofuels and Bioenergy*, v. 1, p. 55-63, 2015.
- SRIVASTAVA, N. et al. **Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and Limitations.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 82, p. 2379–2386, 2018.
- STROPARO, E. C. et al. **Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico.** *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.
- SU, R. et al. **Ethanol Production from High-Solid SSCF of Alkaline-Pretreated Corncob Using Recombinant *Zymomonas mobilis* CP4.** *Bioenerg. Res.*, v. 6, p. 292-299, 2013.
- SUHARA, H. et al. **Screening of selective lignin-degrading basidiomycetes and biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of bamboo culms.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 75, p. 176-180, 2012.
- SUMPHANWANICH, J. et al. **Evaluation of dilute-acid pretreated bagasse, corn cob and rice straw for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*.** *Annals of Microbiology*, v. 58, p. 219-225, 2008.
- SUN, S. et al. **The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials.** *Bioresource Technology*, v. 199, p. 49–58, 2016.
- TIMUNG, R. et al. **Optimization of dilute acid and hot water pretreatment of different lignocellulosic biomass: A comparative study.** *Biomass and Bioenergy*, v. 81, p. 9-18, 2015.
- TOSCAN, A. **Efeito do pré-tratamento hidrotérmico no rendimento da hidrólise enzimática do capim-elefante.** 2013. 146f. Dissertação (Mestrado). Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2013.
- TRAJANO, H. L. et al. **The fate of lignin during hydrothermal pretreatments.** *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, 2013.

TRAKARNPAIBOON, S. et al. **Enhanced Production of Raw Starch Degrading Enzyme Using Agro-Industrial Waste Mixtures by Thermotolerant Rhizopus Microsporus for Raw Cassava Chip Saccharification in Ethanol Production.** Preparative Biochemistry & Biotechnology, v. 47, 2017.

UMAGILIYAGE, A. L. et al. **Laboratory scale optimization of alkali pretreatment for improving enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse.** Industrial Crops and Product, v. 74, p. 977–986, 2015.

UPPUGUNDLA, N. et al. **A comparative study of ethanol production using dilute acid, ionic liquid and AFEX™ pretreated corn stover.** Biotechnology for Biofuels, p. 7-72, 2014.

VIEIRA, R. C. et al. **Caracterização físico-química da palha e sabugo de milho.** 5º Encontro Nacional de Tecnologia Química, Maceió – AL, 2012.

VIEIRA, R. C. et al. **Estudo do processo de hidrólise de resíduos lignocelulósicos do milho para produção de bioetanol.** Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis, SC, 2015.

VIEIRA JÚNIOR, C. M. et al. **Produção e análise do Syngas a partir do sabugo de milho.** Brazilian Journal of Development, v. 6, p. 33116-33123, 2020.

YOON, L. W. et al. **Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production.** Biomass and Bioenergy, v. 67, p. 319-338, 2014.

YU, Q. et al. **Structural characteristics of corncob and eucalyptus contributed to sugar release during hydrothermal pretreatment and enzymatic hydrolysis.** Cellulose, v. 24, p. 4899–4909, 2017.

YU, Z. et al. **Evaluation of the Factors Affecting Avicel Reactivity Using Multi-Stage Enzymatic Hydrolysis.** Biotechnology and Bioengineering, v. 109, 2012.

ZHANG, J. et al. **Effects of different pre-extractions combining with chemi-thermomechanical treatments on the enzymatic hydrolysis of wheat straw.** Bioresource Technology, v. 175, p. 75-81, 2015.

ZHANG, X.; ZHANG, Y. P. **Cellulases: characteristics, sources, production, and applications.** Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers, p. 131-146, 2013.

ZHAO, X. et al. **Organosolv fractionating pre-treatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification: chemistry, kinetics, and substrate structures.** Biofuels, Bioprod. Bioref. v. 11, p. 567–590, 2017.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. **Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production.** Int. J. Agric & Biol. Eng. v. 2, 2009.

ZHU, Z. et al. **Efficient sugar production from sugarcane bagasse by microwave assisted acid and alkali pretreatment.** Biomass and Bioenergy, v. 93, p. 269-278, 2016.

ZIGLIO, B. R. et al. **Elaboração de Pães com Adição de Farinha de Sabugo de Milho.** Revista Ciências Exatas e Naturais, v. 9, 2007.