UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

NATHÁLIA DE VASCONCELOS GOMES

APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO PRODUZIDO POR *Penicillium* sp. FSDE 15 NA CONVERSÃO DA BIOMASSA DO PÉ DE MILHO EM AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS

JOÃO PESSOA – PB
2024

NATHÁLIA DE VASCONCELOS GOMES

APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO PRODUZIDO POR *Penicillium* sp. FSDE 15 NA CONVERSÃO DA BIOMASSA DO PÉ DE MILHO EM AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação de Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa

JOÃO PESSOA – PB
2024

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

G633a Gomes, Nathalia de Vasconcelos.
APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO PRODUZIDO POR *Penicillium* sp. FSDE 15 NA CONVERSÃO DA BIOMASSA DO PÉ DE MILHO EM AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS / Nathalia de Vasconcelos Gomes. - João Pessoa, 2024.
45 f.

Orientação: Carlos Alberto Bispo de Sousa Sousa.
TCC (Graduação) - UFPB/CT.

1. etanol de segunda geração, biomassa lignocelulósic. I. Sousa, Carlos Alberto Bispo de Sousa. II. Título.

UFPB/CT/BSCT CDU 66.01(043.2)

Elaborado por ONEIDA DIAS DE PONTES - CRB-CRB15/198

NATHÁLIA DE VASCONCELOS GOMES

APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO PRODUZIDO POR *Penicillium* sp. FSDE 15 NA CONVERSÃO DA BIOMASSA DO PÉ DE MILHO EM AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação de Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovado em 14 de Outubro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Carlos Alberto Bispo de Sousa

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

(Orientador)

Profa. Dra. Sharline Florentino de Melo Santos – DEQ/CT/UFPB

(Examinadora)

Laís Cabral M. de Assis

Pós graduanda Laís Cabral Madureira de Assis – DEA/CT/UFPB

(Examinadora)

Aos meus pais e à minha irmã,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo dom da vida e por ter me dado forças e saúde para concluir mais uma etapa da minha jornada.

Agradeço aos meus pais, Marcus Anthonius e Vancleide, pelo apoio emocional, financeiro e, acima de tudo, pelo amor e paciência incondicionais. Amo vocês.

Agradeço à minha irmã, Thainá, por estar sempre ao meu lado quando precisei e por me dar os conselhos mais sensatos. Te admiro.

Agradeço por todo o apoio e carinho da minha madrinha, Suely, que agora cuida de mim lá de cima. Saudades eternas.

Agradeço ao meu namorado, Pedro Jorge, por todo o apoio e por estar sempre disposto a me ajudar e ouvir. Obrigada pela parceria.

Agradeço aos meus amigos, Isaque, Jadson, Laís, Eike, Jerffeson, Leonardo e Gabriel. Vocês tornaram essa jornada mais leve e divertida.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Bispo, por todo o conhecimento compartilhado orientações e paciência.

Agradeço ao LPFD e, em especial, aos estagiários Thaís e Jonathan pela ajuda e pelas conversas, que tornaram as longas horas de experimentos mais curtas e leves.

Agradeço ao técnico do LPFD, Sófacles, por facilitar o andamento dos experimentos com instruções assertivas e didáticas, além de sua paciência ao longo de todo o processo.

Agradeço ao LaBio por disponibilizar os equipamentos necessários e à técnica Débora pela ajuda.

Tudo é vário. Temporário. Efêmero. Nunca somos, sempre estamos.

Chico Buarque

RESUMO

Com o desgaste contínuo das reservas de combustíveis fósseis e o aumento das emissões de gases nocivos à atmosfera, cresce a necessidade de explorar energias que sejam renováveis, sustentáveis e acessíveis. Nesse sentido, o etanol de segunda geração tem ganhado destaque como uma opção viável aos combustíveis tradicionais, já que é produzido a partir de materiais lignocelulósicos, como resíduos agrícolas. O pé de milho é um resíduo gerado em grande quantidade após a colheita do milho, cuja composição possibilita sua utilização na produção de bioetanol de segunda geração. O objetivo deste trabalho foi caracterizar físico-quimicamente a biomassa de milho e estabelecer valores adequados para os parâmetros da hidrólise enzimática da biomassa, utilizando o complexo celulolítico produzido por *Penicillium* sp. FSDE 15. Além disso, promoveu-se o pré-tratamento ácido do resíduo e realizou-se a hidrólise enzimática antes e após o pré-tratamento, com a quantificação dos açúcares redutores (AR) produzidos. Os licores obtidos durante o pré-tratamento e a hidrólise enzimática foram fermentados, e os valores de °Brix e AR foram quantificados antes e após o processo, acompanhando o consumo de açúcares fermentescíveis. Durante os ensaios de hidrólise, o pico de produção de açúcares redutores nos primeiros minutos de reação demonstrou a eficiência da conversão da celulose em glicose, com produtividade de 24,2%, evidenciando a aplicabilidade do complexo enzimático obtido por *Penicillium* sp. FSDE 15 para obtenção de açúcares fermentescíveis da biomassa *in natura*. A hidrólise enzimática após o pré-tratamento ácido mostrou uma produção de AR 4 vezes menor do que a HE da biomassa *in natura*, evidenciando a produção de inibidores durante o pré-tratamento. Os licores, após a filtração do pré-tratamento ácido e a hidrólise enzimática, foram fermentados, e os valores máximos de geração de etanol foram de 1,828 g/L após a primeira lavagem do resíduo do pré-tratamento e de 1,354 g/L após a hidrólise enzimática do material *in natura*. Verificou-se que a utilização de fungos filamentosos, que geralmente não são usados comercialmente para a produção de celulases, representa uma nova alternativa para o aproveitamento integral do milharal após a colheita. Além disso, o pé de milho apresenta grande potencial para a produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chave: etanol de segunda geração, biomassa lignocelulósica, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

With the continuous depletion of fossil fuel reserves and the increase in emissions of harmful gases into the atmosphere, the need to explore renewable, sustainable, and accessible energy sources is growing. In this regard, second-generation ethanol has gained prominence as a viable alternative to traditional fuels, as it is produced from lignocellulosic materials, such as agricultural waste. Corn stover is a waste generated in large quantities after corn harvesting, and its composition allows for its use in the production of second-generation bioethanol. The objective of this study was to physicochemically characterize corn biomass and establish suitable values for the parameters of enzymatic hydrolysis of the biomass using the cellulolytic complex produced by *Penicillium sp. FSDE 15*. Additionally, acidic pre-treatment of the residue was conducted, and enzymatic hydrolysis was performed before and after the pre-treatment, with the quantification of reducing sugars (RS) produced. The liquors obtained during the pre-treatment and enzymatic hydrolysis were fermented, and the °Brix and RS values were quantified before and after the process, monitoring the consumption of fermentable sugars. During the hydrolysis trials, the peak production of reducing sugars in the first few minutes of reaction demonstrated the efficiency of converting cellulose into glucose, with a productivity of 24.2%, highlighting the applicability of the enzymatic complex obtained from *Penicillium sp. FSDE 15* for obtaining fermentable sugars from raw biomass. Enzymatic hydrolysis after acidic pre-treatment showed RS production four times lower than that from the raw biomass, indicating the production of inhibitors during the pre-treatment. The liquors, after filtering the acidic pre-treatment and enzymatic hydrolysis, were fermented, with maximum ethanol yields of 1.828 g/L after the first wash of the pre-treated residue and 1.354 g/L after the enzymatic hydrolysis of the raw material. It was found that the use of filamentous fungi, which are generally not commercially used for the production of cellulases, represents a new alternative for the complete utilization of cornfields after harvesting. Furthermore, corn stover shows great potential for the production of second-generation ethanol.

Keywords: second-generation ethanol, lignocellulosic biomass, enzymatic hydrolysis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

1.1 Objetivo geral 12

1.2 Objetivos específicos 12

2 REVISÃO DA LITERATURA 13

2.1 Biomassa lignocelulósica 13

2.1.1 Pé de milho 13

2.2 Estrutura lignocelulósica vegetal 14

2.2.1. Celulose e Hemicelulose 14

2.2.2. Lignina 15

2.3. Produção de celulases por fermentação em estado sólido (FES) 15

2.4. Pré-tratamento do material lignocelulósico 16

2.5. Hidrólise enzimática 17

3 MATERIAIS E METODOLOGIA 19

3.1. Obtenção do extrato enzimático 19

3.1.1. Preparo do inóculo 19

3.1.2. Fermentação em meio sólido (FES) 20

3.2 Determinação da atividade enzimática das celulases 21

3.2.1. CMCase 22

3.2.2. FPase 23

3.3 Planejamento experimental para determinar as melhores condições da hidrólise enzimática 24

3.4 Caracterização da biomassa 24

3.4.1 pH 25

3.4.2 Umidade 25

3.4.3 Sólidos solúveis totais (°Brix) 26

3.4.4 Açúcares redutores (AR) 26

3.5 Pré-tratamento ácido da biomassa de milho 27
3.6 Hidrólise enzimática 28
3.7 Fermentação dos licores do pré-tratamento e da hidrólise enzimática 29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 30
4.1. Caracterização físico-química da biomassa de milho 30
4.2. Análise do planejamento experimental 31
4.2.1. CMCase 31
4.2.2. FPase 35
4.3. Hidrólise enzimática da biomassa *in natura* 36
4.4. Comparação da hidrólise enzimática da biomassa *in natura* e pré-tratada 37
4.5. Produção de etanol a partir da fermentação dos licores do pré-tratamento ácido e da hidrólise enzimática 38
5 CONCLUSÕES 40
REFERÊNCIAS 42

1 INTRODUÇÃO

A contínua necessidade de mudança no cenário energético tem sido cada vez mais presente nas discussões políticas ao redor do mundo, uma vez que o aumento da temperatura da Terra vem ocasionando potenciais alterações climáticas, produto da elevada emissão de gases do efeito estufa na atmosfera. Nesse cenário, surge a busca por novas alternativas sustentáveis de baixo custo para substituir os combustíveis não renováveis (Li *et al*., 2020).

Nesse cenário, é essencial buscar novas maneiras de produção, aproveitando diversas fontes de matéria-prima, incluindo o uso de resíduos provenientes da agroindústria. Dentre as alternativas disponíveis, os materiais lignocelulósicos chamam a atenção pelo seu alto potencial na produção de etanol de segunda geração, representando uma solução promissora para o setor energético (Bohn, 2018).

No Brasil, a cada ciclo de plantio, a colheita de milho resulta em cerca de 90 milhões de toneladas de grãos anualmente (CONAB, 2023). Esse volume expressivo vem acompanhado de uma grande quantidade de resíduos agrícolas, já que o cultivo de milho pode produzir entre 6 e 12 toneladas de resíduos por hectare (Embrapa, 2011). O resíduo lignocelulósico em questão, consiste em palha, caule, folhas e sabugo, normalmente deixados no solo após a colheita para a ciclagem de seus nutrientes, com enfoque na cultura sucessiva.

Para produzir etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos, é necessário inicialmente quebrar a celulose e a hemicelulose em açúcares simples, que depois serão convertidos em bioetanol. No entanto, esses polissacarídeos estão fortemente ligados à lignina, que torna a parede celular resistente e dificulta essa quebra (Bohn, 2018). Para otimizar o acesso à celulose e hemicelulose na etapa de hidrólise, é essencial submeter a biomassa a um pré-tratamento, que pode ser físico, químico ou mecânico, aumentando assim sua área superficial (Baksi *et al*., 2019). A eficácia dessa etapa é determinante para maximizar a liberação de açúcares, sendo um ponto crítico para aprimorar o desempenho geral do processo (Galbe e Zacchi, 2012).

O meio biológico mais comumente utilizado para a conversão de celulose ao seu monômero (glicose) é a hidrólise enzimática, uma vez que produz menos inibidores do que a hidrólise ácida, além de gerar produtos que causam um menor impacto ambiental. (Nunes *et al*., 2013). A degradação da celulose, através da hidrólise enzimática, é

realizada de forma mais eficaz a partir das celulases, enzimas produzidas com maior eficiência proveniente de fungos (Catelan e Pinotti, 2019).

A produção de bioetanol ainda enfrenta obstáculos econômicos significativos, principalmente por conta do alto custo das enzimas celulases, essenciais para a degradação da celulose presente na biomassa e a geração de açúcares fermentáveis. Esses custos estão diretamente relacionados à eficiência com que as enzimas são produzidas, geralmente por fungos, e à quantidade de atividade enzimática recuperada no extrato bruto após a fermentação. Dessa forma, a produção de celulase se torna um elemento chave para a hidrólise de materiais celulósicos e é crucial para viabilizar a conversão de biomassa lignocelulósica em bioetanol (Santos, 2014).

1.1 Objetivo geral

Avaliar a aplicação do extrato enzimático produzido pelo *Penicillium* sp. FSDE 15 na hidrólise da biomassa de milho e na produção de etanol pela fermentação do caldo obtido.

1.2 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar a biomassa do pé de milho;
- Fazer o pré-tratamento ácido da biomassa do pé de milho;
- Produzir o extrato enzimático por cultivo em estado sólido usando o *Penicillium* sp. FSDE 15 e estabelecer as melhores condições de pH e temperatura para hidrólise enzimática;
- Realizar a hidrólise da biomassa do pé de milho *in natura* e pré-tratada;
- Promover a fermentação dos licores após filtração do pré-tratamento ácido e após a hidrólise enzimática.

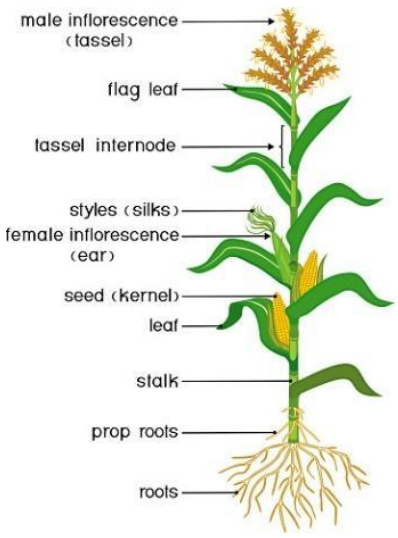
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biomassa lignocelulósica

2.1.1 Pé de milho

O milho (Zea mays L.), pertencente à família Gramineae/Poaceae, é uma planta monóica com estruturas reprodutivas de ambos os sexos. Sua estrutura distinta é fruto da remoção, compactação e multiplicação de elementos presentes na anatomia típica das gramíneas. Essas características garantem sua eficiência reprodutiva e adaptabilidade. (Magalhães *et al*., 2020). O pé de milho é composto por raízes fibrosas e caule segmentado, que pode chegar a até 2 metros de altura. As flores masculinas da planta encontram-se no pendão, localizado no topo. Além disso, as flores femininas ficam nas espigas, que crescem ao longo do caule e desenvolvem os grãos após a polinização. Os "cabelos", chamados de estigmas ou estilos, localizados nas espigas, retêm o pólen, permitindo a reprodução e a formação dos grãos, que são as sementes do milho. A Figura 1 ilustra os componentes da planta do milho.

Figura 1 - Representação das estruturas do pé de milho.



Fonte: Gould *et al.* (2017).

Conforme dados da CONAB (2024), no Brasil, a extensão de terras dedicadas ao cultivo de milho é de 78,53 milhões de hectares, e a estimativa de produção para a safra

2024/2025 é de 119,1 milhões de toneladas. No entanto, essa grande produção gera também uma grande quantidade de resíduos, entre 10 e 12 toneladas por hectare de colheita de milho, sendo divididos em: colmos (50%), folhas (20%), sabugos (20%) e palha (10%) (Gould, 2007). Esses resíduos variados possuem composições lignocelulósicas que diferem entre si, mantendo semelhança nos níveis de celulose, mas apresentando quantidades distintas de hemicelulose e lignina (Sheehan *et al*., 2017).

O pé de milho apresenta características que potencializam seu uso além das aplicações convencionais, como cobertura de solo, fonte de matéria orgânica e alimentação animal, devido ao seu ciclo de crescimento curto e menor teor de lignina em comparação com outras fontes vegetais, como árvores (Gould, 2007). Por isso, a biomassa se destaca como matéria-prima promissora para a produção de bioetanol de segunda geração (2G). A Figura 2 mostra a composição química da biomassa de milho.

Figura 2 - Composição química do caule, folha e palha do pé de milho.

	Cinzas	Extrativos	Lignina Total	Celulose	Hemicelulose
Caule (%)	2,86±1,34	25,36±1,64	17,46±2,60	37,01±1,63	28,44±0,88
Folha (%)	5,79±0,12	25,46±1,53	13,24±2,04	33,32±1,16	28,29±0,96
Palha (%)	3,15±0,13	22,61±2,54	11,54±1,17	30,93±1,11	31,01±1,70

Fonte: (Bohn, 2018).

2.2 Estrutura lignocelulósica vegetal

2.2.1. Celulose e Hemicelulose

De acordo com Rodrigues *et al*. (2017), a celulose se destaca como o principal elemento nos materiais lignocelulósicos. Esse carboidrato complexo é composto por moléculas de glicose conectadas através de ligações β-1,4-glicosídicas. As cadeias de celulose se organizam e se estabilizam por meio de ligações de hidrogênio, que ocorrem tanto entre as próprias moléculas quanto entre diferentes cadeias. Isso resulta na formação de microfibrilas elementares, que consistem em cerca de 36 cadeias empilhadas e têm uma largura que varia de 3 a 4 nm (Martins, 2018).

As microfibrilas que constituem a celulose se entrelaçam por meio da hemicelulose, que ocupa o segundo lugar em termos de abundância na composição da

lignocelulose. A hemicelulose é um polissacarídeo amorfo que consiste em uma mistura de açúcares com cinco e seis carbonos, como arabinose, galactose, glicose, manose e xilose, além de desoxiaçúcares e ácidos urônicos. Essas estruturas são envoltas pela lignina, um polímero aromático que é formado por três componentes fenólicos principais: álcool p-cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, junto com seus respectivos derivados (Rodrigues *et al*., 2017).

2.2.2. Lignina

A lignina compõe entre 10% e 20% da biomassa lignocelulósica, dependendo da espécie. É constituída por unidades de fenilpropano, mantidas unidas por vários tipos de ligações, e está intimamente ligada à hemicelulose e à celulose, atuando como uma "cola" que as mantém juntas, conferindo resistência à parede celular vegetal. A lignina é hidrofóbica, o que impede a entrada de água nas paredes celulares, protegendo a celulose e a hemicelulose. Além disso, é extremamente resistente à degradação química e enzimática, sendo responsável por proteger a biomassa lignocelulósica do ataque bacteriano (Rodrigues *et al*., 2017).

A lignina pode ser extraída da biomassa lignocelulósica por tratamentos físicos, químicos e/ou bioquímicos. Em geral, os tratamentos químicos levam à quebra de ligações éster e éter entre a lignina e os polissacarídeos da parede celular, além das ligações éter arílicas e difenil éter da estrutura macromolecular da lignina, resultando na formação de fragmentos de menor massa molecular (Figueiredo *et al.*, 2017).

Devido à complexidade estrutural das biomassas lignocelulósicas, é necessário um pré-tratamento para maximizar seu uso como matéria-prima na produção de compostos químicos de alto valor agregado. Esse pré-tratamento modifica as características físico-químicas da biomassa, alterando a proporção e a distribuição de cada fração, a morfologia estrutural e rompendo a região cristalina da celulose (Lima, 2018).

2.3. Produção de celulases por fermentação em estado sólido (FES)

As enzimas celulolíticas (celulases) são utilizadas na hidrólise de biomassa lignocelulósica na indústria bioenergética (Salomão *et al.*, 2018), sendo compostas por um complexo de três enzimas: endoglucanases, exoglucanases e β-glucosidases. O

complexo enzimático opera de forma harmônica na degradação da sequência de polímeros da celulose (Farinas, 2015). Entretanto, o preço elevado da produção de enzimas constitui uma barreira para a sua utilização em grandes volumes, podendo corresponder a até 40% do custo total do processo (Salomão *et al.*, 2018).

Todavia, as vantagens da rota enzimática, como menor gasto energético e a ausência de subprodutos tóxicos, tornam a utilização das celulases uma via promissora na indústria de energia renovável (Casciatori, 2015). Surgem então alternativas para obtenção de enzimas de baixo custo e elevada eficiência, como a fermentação em estado sólido (FES), que utiliza resíduos agroindustriais como meio de cultivo e fungos filamentosos (Farinas, 2015; Salomão *et al*., 2018).

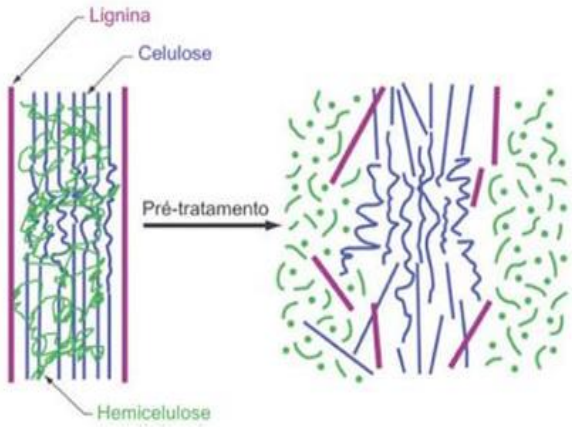
A fermentação em estado sólido (FES) é um processo no qual os microrganismos crescem sobre uma base sólida, com pouca ou nenhuma presença de água livre (Garciagalindo *et al.,* 2019). Esses organismos podem se desenvolver entre as partículas do substrato ou na sua superfície, aproveitando os nutrientes e produzindo diferentes metabólitos e enzimas ao longo do processo (Rodrigues *et al.,* 2015).

Nesse sentido, os fungos filamentosos são mais adequados para a FES devido às suas características estruturais, que permitem colonizar e penetrar no substrato com maior facilidade. As hifas fúngicas se espalham eficientemente e possuem boa tolerância à baixa quantidade de água (Abdullah *et al*., 2014). Além disso, a aplicação de aeração forçada na fermentação em estado sólido (FES) potencializa o crescimento celular e, por consequência, melhora a produção de enzimas (Ambrozim, 2019; Farinas, 2015).

2.4. Pré-tratamento do material lignocelulósico

O material lignocelulósico é principalmente formado por celulose, hemicelulose e lignina, criando uma estrutura vegetal cristalina que é altamente estável. Para acessar a fração sacarídica (celulose e hemicelulose) em forma de açúcares fermentáveis, é imprescindível realizar pré-tratamentos que desestruturem essa composição (Dias *et al*., 2013). Para otimizar o uso da biomassa lignocelulósica, esses pré-tratamentos são necessários para a separação de seus componentes, conforme mostrado na Figura 3. Os processos de deslignificação são fundamentais para quebrar o complexo entre celulose, hemicelulose e lignina, facilitando o fracionamento da biomassa (Melati *et al*., 2017).

Figura 3 - Representação do efeito do pré-tratamento na estrutura da biomassa.



Fonte: Mosier *et al.* (2005).

O pré-tratamento é a etapa na qual toda ou parte da estrutura lignocelulósica da biomassa será quebrada, facilitando a subsequente ação das enzimas no processo de hidrólise, resultando na liberação de açúcares fermentescíveis, como a glicose. A quebra da biomassa pode ser realizada por diferentes métodos, como químicos, com adição de ácidos, bases, solventes orgânicos ou líquidos iônicos; físicos, como pré-tratamentos mecânicos, hidrotérmicos, ultrassônicos ou radiação de micro-ondas; e biológicos, com a utilização de microrganismos, como fungos ou bactérias. Além disso, há combinações de métodos, como o pré-tratamento alcalino assistido por micro-ondas (Mitri *et al*., 2022).

Diferentemente do pré-tratamento ácido, que é focado na hidrólise da hemicelulose, o pré-tratamento alcalino tem como principal objetivo a deslignificação da biomassa, onde ocorre a quebra das ligações éter entre as unidades de fenilpropano, gerando grupos fenólicos e aumentando a reatividade das fibras. Este método varia conforme o substrato e as condições aplicadas, mas, em geral, o pré-tratamento alcalino é mais eficaz em biomassas com alto teor de lignina, como madeira dura e resíduos agrícolas (Pinheiro, 2022).

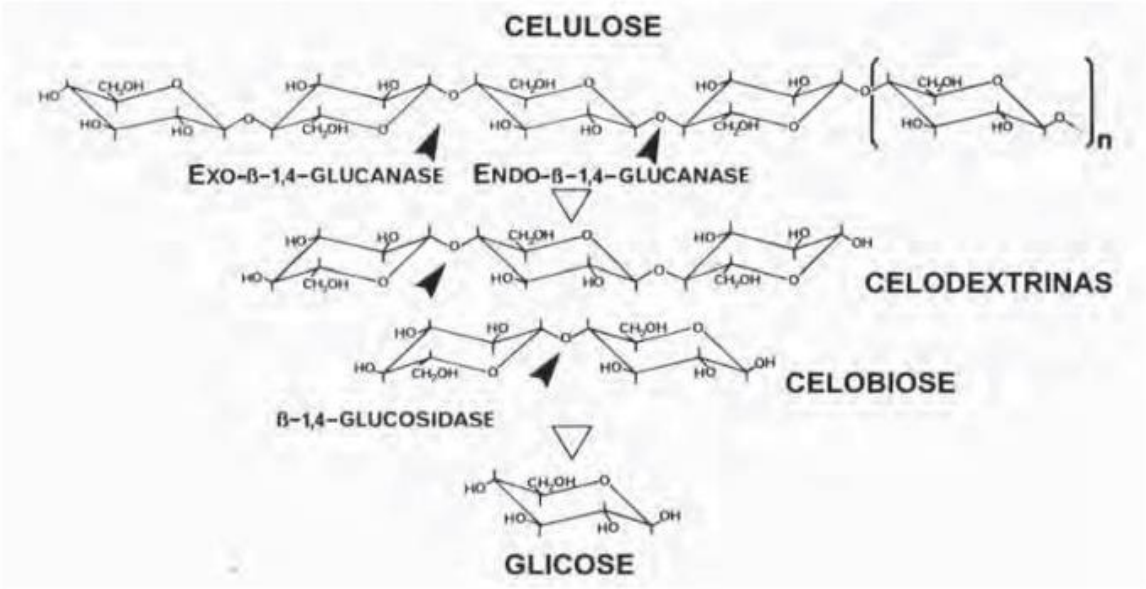
2.5. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática utiliza enzimas, como as celulases, para quebrar a biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis de menor peso molecular. No processo de produção de etanol a partir de material lignocelulósico, as leveduras alcoólicas não têm a capacidade de fermentar diretamente a biomassa, sendo necessário

transformar as cadeias poliméricas de celulose e hemicelulose em moléculas de glicose para que ocorra a fermentação (Souto *et al.*, 2017).

O processo catalítico da hidrólise enzimática da celulose inicia-se com a ligação das celulases à superfície do substrato, prosseguindo com a quebra das ligações β-1,4-glicosídicas. O complexo enzimático celulolítico é composto pelas enzimas endoglucanases, as celobiohidrolases ou exoglucanases e as β-glicosidases ou celobiases, cada classe de celulase rompe uma região da celulose especificamente (Silva, 2011), como representa a Figura 4. Um elemento essencial que afeta a taxa de hidrólise é a capacidade da enzima de acessar os locais de adsorção presentes na estrutura cristalina da celulose (Viikari *et al.*, 2012). Assim, o pré-tratamento é fundamental para aumentar a área superficial do substrato, facilitando a adsorção das enzimas e, consequentemente, a eficiência da hidrólise.

Figura 4 - Enzimas envolvidas na hidrólise da celulose.



Fonte: Mosier *et al*. (2005).

3 MATERIAIS E METODOLOGIA

3.1. Obtenção do extrato enzimático

3.1.1. Preparo do inóculo

Para preparar o meio de cultivo à base de arroz, utilizou-se uma metodologia baseada em protocolos da EMBRAPA/CPATSA, com adaptações realizadas por Mélo (2016) . Inicialmente, cerca de 30 g de arroz foram umedecidos com água destilada, em quantidade suficiente para cobri-los completamente. O arroz permaneceu de molho por aproximadamente 30 minutos. Após esse tempo, o excesso de água foi removido. Em seguida, 10 g do arroz umedecido foram transferidos para frascos de 250 mL (erlenmeyers) e autoclavados por 15 minutos a 121 °C. Após o resfriamento completo do arroz esterilizado, procedeu-se à inoculação do microrganismo.

Para inocular o *Penicillium* sp. FSDE 15 no arroz, uma solução espessante (Tween 80 a 0,3%, v/v) foi adicionada em placas de Petri contendo o fungo e meio ágar-batata. Usando uma alça de platina, os esporos presentes no meio de cultivo foram cuidadosamente desprendidos, formando uma suspensão homogênea. Utilizando um pipetador automático, 1 mL dessa suspensão de esporos foi transferido para cada erlenmeyer contendo o arroz previamente esterilizado.

Os frascos foram fechados com tampão de gaze e algodão, e incubados a 28 °C por um período de 10 a 12 dias, ou até que o arroz estivesse completamente coberto pelos esporos. Após o cultivo, os frascos foram mantidos sob refrigeração, onde poderiam ser armazenados por até três meses, antes de serem utilizados na preparação do inóculo para os ensaios de fermentação.

Foi a realizada a suspensão dos esporos do fungo *Penicillium* sp. FSDE 15 cultivado em meio contendo arroz hidratado. A suspensão foi feita sob agitação manual, utilizando 40 mL de solução espessante (Tween 80 a 0,3%, v/v), suficiente para cobrir o arroz. Em seguida, o inóculo foi filtrado em algodão e reservado para iniciar a fermentação.

Para quantificar a suspensão, foi realizada a contagem de esporos em câmara de Neubauer espelhada, com o auxílio do microscópio. A quantidade da suspensão de esporos adicionada ao meio de fermentação foi ajustada para alcançar uma concentração

de 10^6 esporos por grama de substrato sólido. O ajuste foi realizado a partir das Equações 1 e 2:

$$CI = \sum \text{x} \times 5 \times 10^4 \times f \quad (1)$$

Em que:

CI: concentração do inóculo (esporo/mL);

∑x: número de esporos na câmera de Neubauer (centro e as quatro extremidades);

5: multiplicação de expansão para os 25 quadrantes totais da câmara;

10^4: conversão de mm^3 para cm^3 (já que cada quadrante da câmara apresenta dimensões 1x1x0,1 mm e

f: fator de diluição da amostra (caso tenha ocorrido diluição).

$$V = \frac{Cd \times M}{C} \quad (2)$$

Em que:

Cd: concentração desejada (esporos/g);

V: volume do inóculo (mL);

C: concentração de esporos (esporos/mL) e

M: massa do substrato (100 g).

3.1.2. Fermentação em meio sólido (FES)

Preparou-se o meio de cultivo, seguindo as condições mais adequadas apontadas por Santos (2021). O meio utilizado para realizar o cultivo foi 50% de sabugo de milho e 50% de farelo de trigo umedecido a 60%, o ensaio foi realizado em triplicata, em Erlenmeyers de 500 mL de capacidade contendo 40 g do meio umidificado e 2 mL do inóculo.

Para umedecer o meio de cultivo, utilizou-se uma solução de sulfato de amônia 1% (m/m_{H2O}). Com isso, para preparar a solução, foi necessário calcular a quantidade de água para umedecer cada substrato, a partir do teor de umidade apresentada por cada substrato, como mostra a Equação 3.

$$MA = \frac{MS \times (UI - US)}{1 - UI} \quad (3)$$

Em que:
MA: massa de água (g);
MS: massa de substrato (g);
UI: umidade ideal do substrato e
US: umidade real do substrato.

Os substratos umedecidos foram agitados para uniformização e dispostos em frascos Erlenmeyer de 500 mL para esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente, os frascos com os meios de cultivo foram deixados em temperatura ambiente para resfriamento. Em seguida, foi realizada a inoculação com os esporos previamente suspensos e quantificados conforme a Equação 2. Foi necessário homogeneizá-los bem para garantir um crescimento uniforme do fungo. Após a inoculação, os meios de cultivo foram mantidos em estufa a 30 °C por sete dias e, posteriormente, armazenados em geladeira para análises futuras. A Figura 5 mostra o crescimento do fungo em estufa.

Figura 5 - Crescimento em estufa do fungo *Penicillium* sp. FSDE 15.

3.2 Determinação da atividade enzimática das celulases

O extrato enzimático foi obtido pela adição de 20 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 3,0, 4,5 e 6,0) para cada 1 g do meio fermentado. Após homogeneização e repouso por 30 minutos em temperatura ambiente, a amostra foi filtrada utilizando algodão. O extrato enzimático foi armazenado em geladeira para posterior análise da

atividade de CMCase (endoglicanase) e FPase (celulase total). A determinação da atividade enzimática foi conduzida conforme Ghose (1987), com adaptações.

3.2.1. CMCase

Para a análise de endoglicanase (CMCase), foram inicialmente utilizados dois tubos: um tubo de reação (TUBO R), contendo 1 mL do extrato enzimático e 1 mL de uma solução de carboximetilcelulose (CMC) a 1% (w/w) preparada em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 3,0, 4,5 e 6,0); e um tubo de controle (TUBO S), contendo 1 mL do extrato enzimático e 1 mL do tampão de reação. Após homogeneização, os tubos R e S foram mantidos em banho termostático a 50 °C por 30 minutos.

Em seguida, enquanto os tubos eram resfriados em banho gelado, foram preparados tubos de ensaio, em triplicata, contendo 0,5 mL de DNS (ácido 1,3-dinitrossalicílico) para cada um dos tubos R e S, a fim de interromper a reação. Após o resfriamento, 0,5 mL de cada tubo foi pipetado para os tubos contendo 0,5 mL de DNS. Para zerar o espectrofotômetro, utilizou-se um tubo branco contendo 1 mL de DNS e 1 mL de tampão.

Com isso, a quantificação de açúcares redutores (AR) foi realizada conforme o protocolo descrito por Vasconcelos *et al.* (2017). O extrato enzimático foi centrifugado antes da análise, uma vez que os esporos em suspensão dificultam a leitura de AR. A atividade enzimática foi calculada a partir da Equação 4.

$$CMCase\ \left(\frac{U}{g}\right) = \frac{AR_{liberado} \times 10^6}{180 \times 30} = \frac{(AR_{com\ substrato} - AR_{branco}) \times 10^6}{180 \times 30} \qquad (4)$$

Em que:

$AR_{com\ substrato}$: leitura de açucares redutores no tubo contendo o substrato, onde ocorreu reação enzimática (incluindo fator da curva padrão da glicose);

AR_{branco}: leitura de açúcares redutores no tubo da amostra em branco, onde não houve reação enzimática por não haver substrato (incluindo fator da curva padrão da glicose);

10^6: fator de conversão que transforma grama em micrograma (portanto, mol em micromol);

180: massa molar da glicose (g/mol) e

30: tempo de reação em minutos.

3.2.2. FPase

A atividade de celulase total (FPase) foi determinada a partir da dosagem de açúcares redutores liberados durante a degradação de uma fita de papel de filtro qualitativo medindo 1,0 x 6,0 cm. Foram inicialmente utilizados dois tubos: um tubo de reação (TUBO R), contendo o papel de filtro imerso em 2 mL de extrato enzimático; e um tubo de controle (TUBO S), contendo 2 mL do extrato enzimático. Após homogeneização, os tubos R e S foram mantidos em banho termostático a 50 °C por 30 minutos.

Em seguida, enquanto os tubos eram resfriados em banho gelado, foram preparados tubos de ensaio, em triplicata, contendo 0,5 mL de DNS (ácido 1,3-dinitrossalicílico) para cada um dos tubos R e S, a fim de interromper a reação. Após o resfriamento, 0,5 mL de cada tubo foi pipetado para os tubos contendo 0,5 mL de DNS. Para zerar o espectrofotômetro, utilizou-se um tubo branco contendo 1 mL de DNS e 1 mL de tampão.

Com isso, a quantificação de açúcares redutores (AR) foi realizada conforme o protocolo descrito por Vasconcelos *et al.* (2017). O extrato enzimático foi centrifugado antes da análise, uma vez que os esporos em suspensão dificultam a leitura de AR. A atividade enzimática foi calculada a partir da Equação 5.

$$FPase\left(\frac{U}{g}\right) = \frac{AR_{liberado} \times 10^6}{180 \times 30} = \frac{(AR_{com\ substrato} - AR_{branco}) \times 10^6}{180 \times 30} \qquad (5)$$

Em que:

$AR_{com\ substrato}$: leitura de açucares redutores no tubo contendo o substrato, onde ocorreu reação enzimática (incluindo fator da curva padrão da glicose);

AR_{branco}: leitura de açúcares redutores no tubo da amostra em branco, onde não houve reação enzimática por não haver substrato (incluindo fator da curva padrão da glicose);

10^6: fator de conversão que transforma grama em micrograma (portanto, mol em micromol);

180: massa molar da glicose (g/mol) e

30: tempo de reação em minutos.

3.3 Planejamento experimental para determinar as melhores condições da hidrólise enzimática

As análises de atividade enzimática (CMCase e FPase) foram realizadas em diferentes valores de pH para a extração do meio fermentado (extrato enzimático), utilizando tampão citrato de sódio 50 mM (pH 3,0, 4,5 e 6,0) e diferentes temperaturas (30, 45 e 60 °C). O ensaio foi conduzido conforme um planejamento experimental 2^2 para determinar a melhor condição para realizar a hidrólise enzimática. As Tabelas 1 e 2 exibem, respectivamente, os níveis e a matriz do planejamento. Os níveis foram definidos com base nos estudos de Santos (2021). As análises de atividade enzimática foram realizadas de acordo com os itens 3.2.1 e 3.2.2.

Tabela 1: Níveis do planejamento experimental para a hidrólise.

Variável	**(-1)**	**(0)**	**(+1)**
pH	3,0	4,5	6,0
Temperatura (°C)	30	45	60

Tabela 2: Matriz do planejamento experimental fatorial 2^2 com três repetições no plano central.

Ensaio	**pH**	**Temperatura (°C)**
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

3.4 Caracterização da biomassa

O pé de milho (exceto o sabugo) foi recolhida em roçados de agricultura familiar na região da grande João Pessoa após a colheita do milho. O material foi seco a 60 °C por 24 h e moído em liquidificador. A Figura 6 mostra as etapas da obtenção da biomassa de milho.

Figura 6 - Etapas da obtenção da biomassa de milho.

Na caracterização da biomassa, foram avaliados os seguintes parâmetros físico-químicos: pH, umidade, sólidos solúveis totais (°Brix) e açúcares redutores (AR). As análises foram feitas em triplicata.

3.4.1 pH

A determinação do pH foi realizada de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (Brasil, 2005), utilizando-se um pHmetro. Foi adicionado 1 g da biomassa a 20 mL de água destilada. Após agitação magnética por 20 minutos, a mistura foi filtrada em algodão. O filtrado foi recolhido para leitura.

3.4.2 Umidade

A umidade da biomassa, em base seca, foi determinada pela diferença entre a massa da amostra úmida e após secagem em estufa a 105 °C por 24 horas (MORAIS *et*

al., 2010). Pesou-se 2 g da amostra em cadinhos previamente tarados e secos em estufa. Em seguida, foram resfriados em dessecador por 30 minutos e pesados. O resultado foi expresso em porcentagem (m/m). O teor de umidade foi determinado pela Equação 6:

$$TU\ (\%) = \frac{(MRAU - MRAS)}{MAU} \times 100\% \qquad (6)$$

Em que:
TU = teor de umidade da amostra, %;
MRAU = massa do conjunto recipiente/amostra úmida;
MRAS = massa do conjunto recipiente/amostra seca e
MAU = massa da amostra úmida.

3.4.3 Sólidos solúveis totais (°Brix)

A leitura do °Brix foi realizada diretamente em refratômetro de Abbe, segundo o procedimento descrito pelas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (Brasil, 2005). Após adição de 1 g da amostra a 10 mL de água destilada, a mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 30 minutos. Após filtração em algodão, o filtrado foi centrifugado por 2 minutos a 120 rpm e levado ao refratômetro para a leitura. O valor obtido foi multiplicado pelo fator de diluição.

3.4.4 Açúcares redutores (AR)

Os açúcares redutores foram quantificados com base no procedimento descrito por Miller (1959), que consiste na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico a 3-amino-5 nitrosalicílico (DNS), com a oxidação simultânea do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico.

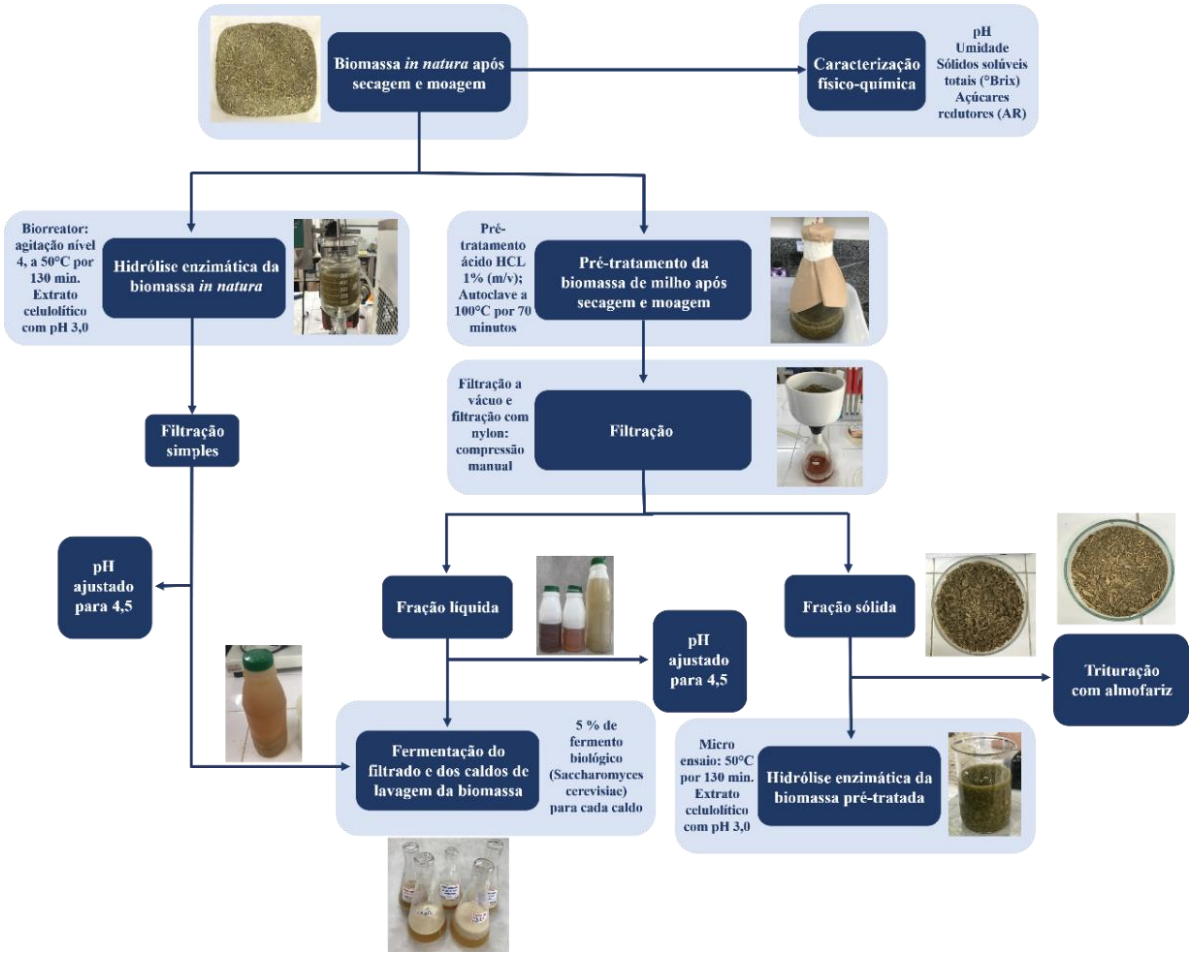
Em um béquer, foi adicionado 1 g da biomassa e 100 mL de água, mantidos sob agitação por 30 minutos. Após a filtração com algodão, transferiu-se 1 mL do filtrado para um tubo de ensaio contendo 1 mL de solução DNS. Um branco foi preparado com 1 mL de DNS e 1 mL de água destilada. Os tubos contendo as réplicas do experimento e o

branco ficaram em banho de água fervente por exatos 5 minutos. Em seguida, os tubos foram retirados do banho e resfriados à temperatura ambiente. Após o resfriamento, foram adicionados 8 mL de água destilada a cada tubo e, após homogeneização, foi feita a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro a 540 nm (Vasconcelos *et al.*, 2017).

3.5 Pré-tratamento ácido da biomassa de milho

A Figura 7 ilustra as etapas dos processamentos de pré-tratamento seguido de hidrólise enzimática e fermentação.

Figura 7 – Diagrama geral dos processos de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação.



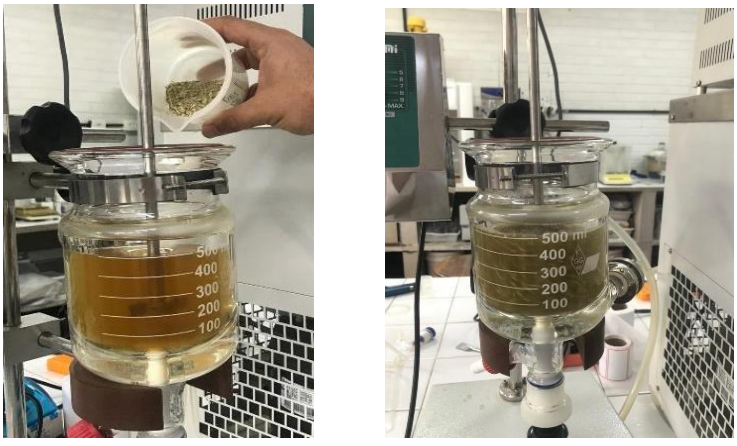
O pré-tratamento foi conduzido em autoclave a 100°C por 70 minutos (Santos, 2021), com proporção de material lignocelulósico/ácido de 1:10. Em um Erlenmeyer de 1000 mL, pesaram-se 40 g de biomassa de milho e 400 mL de solução de ácido sulfúrico a 1% (m/v), e a mistura foi homogeneizada adequadamente. Após o ensaio, realizou-se a filtração a vácuo, e o filtrado original foi armazenado. Posteriormente, a filtração foi

realizada com filtro de nylon e compressão manual; o material foi lavado com água destilada, e o filtrado resultante foi armazenado. Em seguida, o resíduo foi lavado até que o pH da água fosse obtido, em torno de 6,0. Logo após, a biomassa de milho foi recolhida e seca a 60°C por 24 horas.

3.6 Hidrólise enzimática

De acordo com Oliveira (2017), pesaram-se 10 g da biomassa *in natura* e 500 mL do extrato enzimático bruto preparado a partir do melhor ensaio de pH realizado no planejamento experimental do item 3.4, extraído na proporção de 20 mL para cada grama de carga enzimática (meio fermentado) (Santos, 2021). O ensaio foi conduzido em biorreator da marca Marconi, sob agitação (nível 4 do equipamento), por 130 minutos, a 50°C (melhor temperatura do planejamento experimental). Nos primeiros 20 minutos, de 5 em 5 minutos, foram retiradas amostras de 6 mL para realizar leitura de AR, além do ponto 0, recolhido após a homogeneização da biomassa. Posteriormente, foram retiradas alíquotas em intervalos de tempo variáveis até atingir 130 minutos, totalizando 12 pontos para realizar leitura de AR (açúcares redutores), seguindo a metodologia descrita por Vasconcelos *et al.* (2017). A Figura 8 mostra o processo de hidrólise enzimática.

Figura 8 - Hidrólise enzimática em biorreator do tipo CSTR. (a) biorreator apenas contendo o extrato enzimático bruto; (b) após adição da biomassa de pé de milho.



(a) (b)

No entanto, para a hidrólise do resíduo de milho após o pré-tratamento, foi realizado um micro ensaio, 1g da biomassa pré-tratada foi pesada após moagem com ajuda do almofariz e 50 mL de extrato enzimático bruto preparado a partir do melhor

ensaio de pH realizado no planejamento experimental do item 3.4, na proporção de 20 mL para cada grama de carga enzimática (meio fermentado) (Santos, 2021). O ensaio foi conduzido em banho-maria, sob agitação manual, por 130 minutos, a 50°C (melhor temperatura do planejamento experimental). Nos primeiros 20 minutos, de 5 em 5 minutos, foram retiradas amostras de 6 mL para realizar leitura de AR, além do ponto 0, recolhido após a homogeneização da biomassa. Posteriormente, foram retiradas alíquotas em intervalos de tempo variáveis até atingir 130 minutos, totalizando 12 pontos para realizar leitura de AR (açúcares redutores), seguindo a metodologia descrita por Vasconcelos *et al.* (2017).

3.7 Fermentação dos licores do pré-tratamento e da hidrólise enzimática

Antes do processo de fermentação, foi necessária a correção do pH dos licores para o valor ótimo para as leveduras (pH = 4,5). Para isso, foi preparada uma solução de NaOH (0,2 M), que foi gotejada nos licores ácidos do pré-tratamento. Nos licores após a hidrólise enzimática, a correção foi realizada com uma solução de citrato de sódio (0,1 M). Em ambos os casos, um pHmetro foi utilizado para controlar o ajuste do pH. A proporção utilizada na fermentação foi de 5% (m/v) de levedura para cada mL de licor, a fermentação foi realizada em temperatura ambiente e sem agitação. As leituras de sólidos solúveis (°Brix) e de açúcares redutores (AR) foram realizadas antes e após 24 horas de fermentação, com o objetivo de monitorar o consumo de açúcares e a produção de etanol. A Figura 9 mostra os Erlenmeyers contendo os licores fermentados após o período estabelecido.

Figura 9 - Licores fermentados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização físico-química da biomassa de milho

A princípio, foi realizada a caracterização físico-química do pé de milho, considerando que o estudo prévio do resíduo vegetal pode contribuir para a eficiência do processo de conversão da biomassa em açúcares fermentáveis. Para isso, foram analisados parâmetros como umidade, pH, °Brix e açúcares redutores (AR), cujos valores estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização da biomassa (base seca).

Parâmetros analisados	Valores
Umidade (%)	8,9 ± 0,11
Teor de sólidos solúveis totais (°Brix)	2,58 ± 0,14
pH	4,96 ± 0,02
AR (g/L)	0,77 ± 0,008

O teor de umidade do pé de milho, cerca de 8,9%, indicou que o material possui uma boa capacidade de armazenamento e conservação, uma vez que teores elevados de umidade (acima de 10%) favorecem o crescimento de microrganismos (Meneguetti *et al.*, 2010), causando deterioração da biomassa, comprometendo sua qualidade e competindo com as enzimas utilizadas no processo de hidrólise. Nesse sentido, Bohn (2018) obteve valores semelhantes de umidade para materiais lignocelulósicos, como caule (7,46%), folha (5,9%) e palha (5,24%), assim como Carvalho (2016), que relatou um teor de umidade de 8,49% para a palha de milho.

O pH do pé de milho, de aproximadamente 4,96, foi adequado, uma vez que não interfere negativamente na hidrólise enzimática. Considerando que as enzimas celulases permanecem estáveis e eficazes em condições de pH ácido (Santos, 2021).

O °Brix de 2,58 mostrou o teor de sólidos solúveis totais – SST (açúcares, polissacarídeos, proteínas e minerais) disponíveis na biomassa. Apesar de ser um valor baixo comparado ao de outros resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de malte, que possui cerca de 17,5 °Brix (Oliveira, 2017), ainda indica um potencial de conversão em açúcares fermentescíveis.

O valor de AR encontrado, 0,77 g/L, confirma o baixo °Brix medido, indicando uma quantidade de açúcares fermentáveis inferior ao esperado. No entanto, o teor de AR pode ser significativamente aumentado após pré-tratamentos que promovem a quebra da recalcitrância da lignina e a exposição das fibras de celulose e hemicelulose, permitindo sua conversão em monômeros como a glicose.

4.2. Análise do planejamento experimental

O planejamento experimental fatorial foi realizado com o intuito de analisar as atividades enzimáticas (CMCase e FPase) em diferentes temperaturas e valores de pH (variáveis independentes), bem como a influência de suas interações na eficiência enzimática. Os níveis foram baseados na estabilidade enzimática estudada por Santos (2021). A Tabela 4 mostra os valores de atividade enzimática de cada ensaio.

Tabela 4 - Atividade celulolítica em função da variação de pH e temperatura.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	FPase (U/g)	CMCase (U/g)
1	-1 (3,0)	-1 (30,0)	19,83	141,52
2	+1 (6,0)	-1 (30,0)	19,06	50,15
3	-1 (3,0)	+1 (60,0)	23,34	168,88
4	+1 (6,0)	+1 (60,0)	22,20	54,89
5	0 (4,5)	0 (45,0)	35,52	104,86
6	0 (4,5)	0 (45,0)	23,21	104,86
7	0 (4,5)	0 (45,0)	25,62	94,10

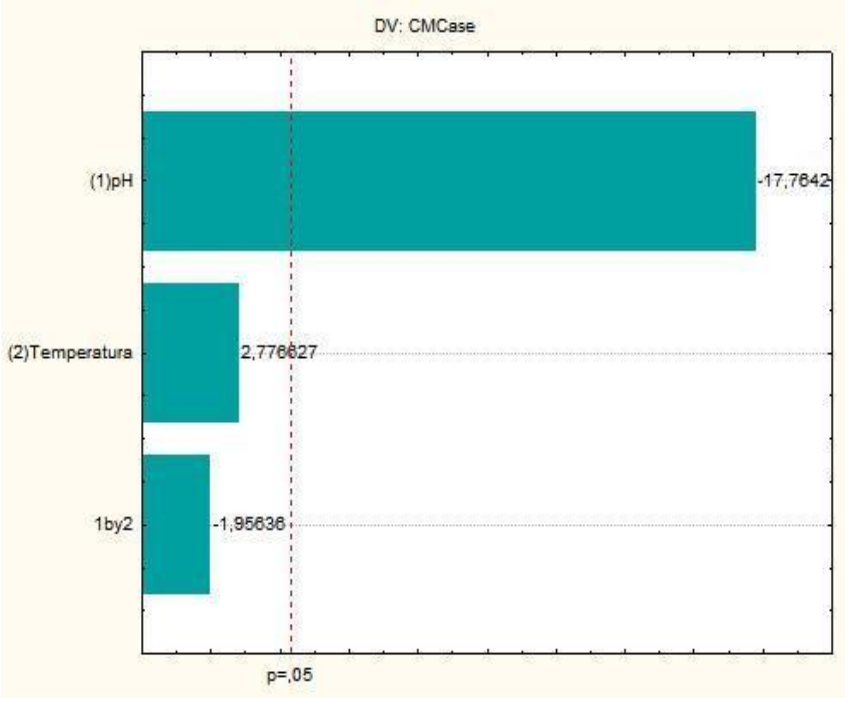
4.2.1. CMCase

O gráfico de Pareto apresenta, de forma visual, quais são os fatores mais significativas em um conjunto de dados, ajudando a identificar as áreas de maior impacto. No contexto experimental, mostra a significância dos efeitos e das interações das variáveis independentes (pH e temperatura) nas variáveis dependentes (atividades enzimáticas).

Dessa forma, o gráfico observado na Figura 10 indica o efeito dos dois parâmetros analisados, além da interação entre eles na variável de resposta (CMCase). Observa-se que o efeito do pH é estatisticamente significativo a 95% de confiança. No entanto, a

interação tem influência negativa sobre o processo, o que pode representar uma redução significativa na atividade enzimática para altos valores de pH.

Figura 10 - Influência dos parâmetros pH e temperatura na eficiência celulolítica (CMCase).



A partir dos resultados obtidos durante o planejamento experimental fatorial, foi possível desenvolver um modelo de regressão linear de primeira ordem para descrever o processo avaliado. O modelo relaciona a atividade celulolítica com as variáveis de pH e temperatura. A análise do modelo revelou uma precisão muito alta, com um coeficiente de determinação R^2 de 99,31%. Esse indicador sugere que o modelo se ajusta aos dados, fornecendo uma explicação confiável das influências das variáveis estudadas sobre a atividade celulolítica. A equação 7 mostra o modelo encontrado ao tratar os dados do planejamento experimental.

$$Atividade\ celulolítica = 102{,}8596 - 51{,}3372\ PH + 8{,}02423\ T - 5{,}6538\ PH.T \quad (7)$$

A Tabela 5 mostra a análise de variância (ANOVA) dos resultados relacionados à atividade enzimática e o resultado do Teste F, que indica a relação entre o $F_{calculado}$ e o $F_{tabelado}$. De acordo com Barros *et al.* (1995), se essa razão for igual ou superior a 1, a regressão é considerada estatisticamente significativa, indicando que há interação entre

as variáveis independentes e dependentes. Ademais, para que a regressão também seja eficaz para previsões, ou seja, um modelo preditivo, a razão deve exceder 4,0.

Desse modo, pode-se observar um valor de 11,273 para o teste F e R^2 foi de 99,31% indicando que as interações da variável dependente são satisfatoriamente explicadas pelo modelo proposto, na faixa de valores estudados para as variáveis analisadas. Os dados revelam que o modelo matemático estudado é significativo a 95% de confiança e pode ser utilizado para fins preditivos.

Tabela 5 - ANOVA do planejamento experimental (CMCase).

Fonte de variação	**Soma quadrática**	**Graus de liberdade**	**Média quadrática**	**F_{cal}**	**F_{tab} (5%)**	**F_{cal}/F_{tab}**
Regressão	10542,05	1	10542,05	114,194	10,130	11,273
Resíduo	461,570	5	92,317			
Falta de ajuste	9,34	1	9,34			
Erro puro	66,810	2				
Total	11003,62	6				
R^2	99,308					

A partir dos resultados foi plotada a descrição gráfica do modelo matemático, a qual resume o que acontece quando cada variável independente, e suas interações são variadas. A superfície de resposta da Figura 11, através da distribuição de cores, mostra que o pH é o parâmetro que mais influência na variável de resposta. Observa-se na superfície o aumento da atividade enzimática para aproximadamente 168,88 U/g quando foi utilizado um pH de 3,0. Além do mais, quando a temperatura foi de 60°C, houve também a maior atividade celulolítica.

Figura 11 - Superfície de resposta para a atividade de CMCase em função do pH e temperatura.

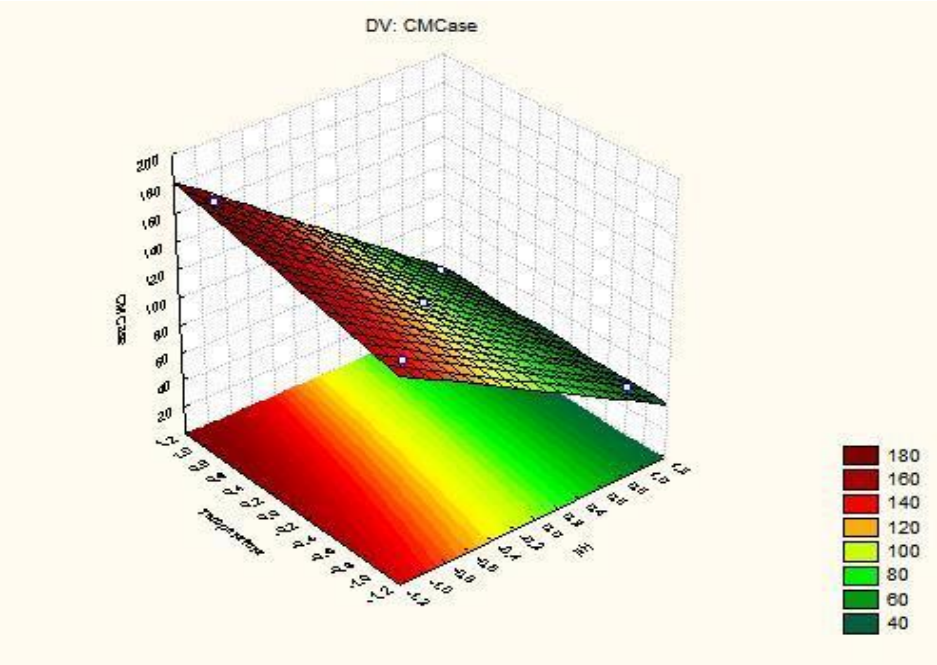
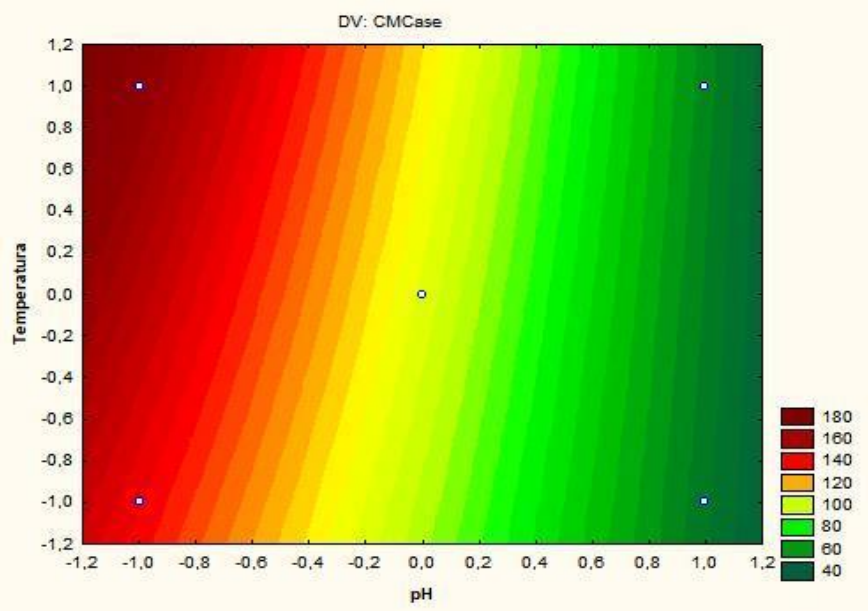


Figura 12 - Gráfico de contorno para a atividade de CMCase em função do pH e temperatura.



A Figura 12 mostra o gráfico de contorno gerado a partir dos dados do planejamento experimental, o gráfico mostra que na região de temperatura de 50°C houve atividade enzimática. A temperatura de 50°C foi escolhida para realizar a hidrólise enzimática, visando garantir a estabilidade térmica das enzimas durante o processo.

4.2.2. FPase

O gráfico observado na Figura 13 indica o efeito das variáveis independentes analisadas, além da interação entre elas na variável de resposta (FPase). Observa-se que o efeito do pH e da temperatura não foi estatisticamente significativo a 95% de confiança. Isso pode ter ocorrido devido à faixa limitada de níveis testados, à possível insensibilidade da enzima FPase às condições específicas geradas pelo planejamento experimental, ou à variabilidade experimental, que pode ter ocasionado erros. No entanto, a Figura 14 mostra uma tendência que vai de encontro com a atividade de CMCase, altas temperaturas (60°C) e baixos valores de pH (3,0).

Figura 13 - Influência dos parâmetros pH e temperatura na eficiência celulolítica (CMCase).

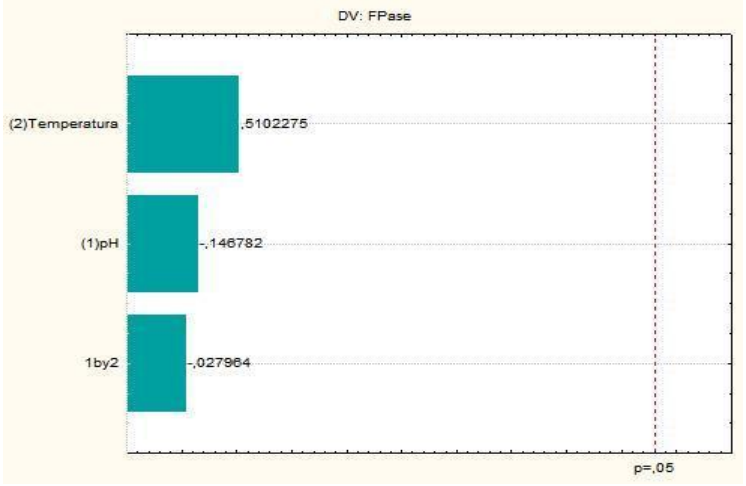
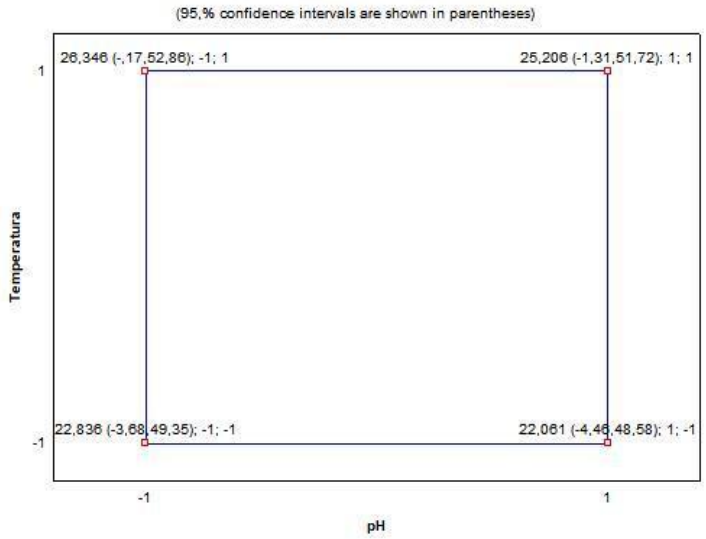


Figura 14 - Médias previstas para a variável FPase.



4.3. Hidrólise enzimática da biomassa *in natura*

A Tabela 6 apresenta os resultados da hidrólise enzimática do pé de milho.

Tabela 6 - Quantificação de AR durante a hidrólise enzimática do pé de milho.

Tempo (minutos)	**AR (g/L)**	**Produtividade (g/L.min)**
0	1,646	0,000
5	2,858	24,243
10	3,336	9,553
15	3,667	6,622
20	3,947	5,595
30	4,221	2,740
45	4,205	-0,101
60	3,968	-1,586
75	4,240	1,814
95	4,247	0,038
115	4,415	0,837
130	4,613	1,319

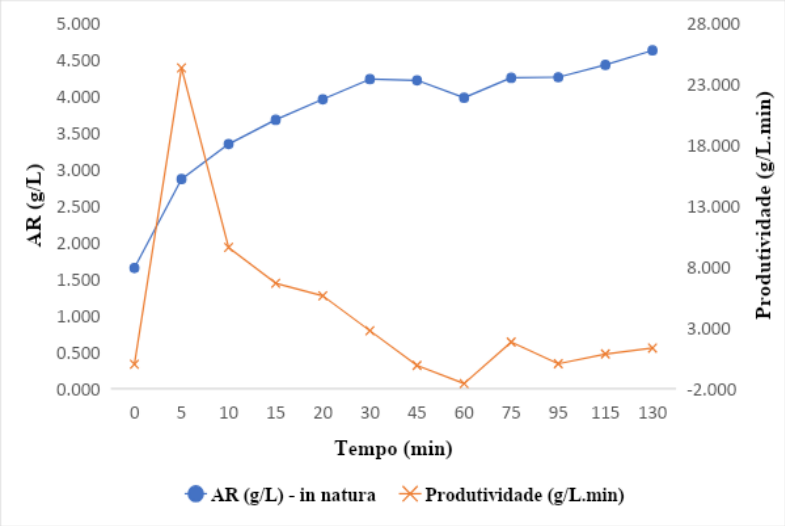
No início do processo de hidrólise enzimática, foi quantificada a atividade celulolítica do ponto 0, da qual se obteve 78,320 U/g. Nos primeiros 5 minutos, há o maior pico de produtividade, 24,243 g/L.min, indicando o início da conversão de celulose em glicose. Após este pico inicial de produtividade, que no decorrer do processo tende a diminuir, observa-se o aumento na quantidade de açúcares redutores, indicando que a enzima continua atuando na quebra das moléculas de celulose.

Em 75 minutos, identificou-se uma quantidade significativa de açúcares redutores presentes no meio. Entretanto, houve uma redução significativa da produtividade, uma vez que, à medida que o meio se torna rico em açúcares, as enzimas sofrem inibição, diminuindo a velocidade do processo de conversão enzimática (Cabiac *et al.*, 2011). Observa-se no gráfico da Figura 15 que o processo tende a estabilizar a partir de 95 minutos.

O processo catalítico da hidrólise enzimática se inicia com a adsorção das celulases na superfície do substrato, seguida pela ruptura das ligações. A taxa de hidrólise é fortemente influenciada pela facilidade com que a enzima pode acessar os sítios de adsorção na estrutura cristalina da celulose (Viikari *et al.*, 2012; Modenbach *et al.*, 2013;

Costa et al., 2021). Portanto, a etapa de pré-tratamento é essencial, pois aumenta a área superficial disponível, facilitando a adsorção da enzima (Cabiac *et al.*, 2011).

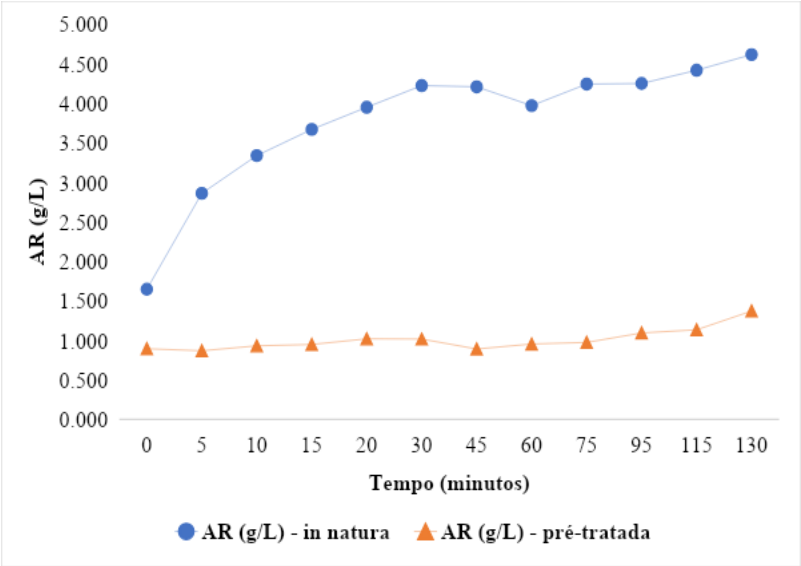
Figura 15 - Gráfico da hidrólise enzimática do pé de milho *in natura*.



4.4. Comparação da hidrólise enzimática da biomassa *in natura* e pré-tratada

A Figura 16 mostra o gráfico de comparação da hidrólise enzimática da biomassa de milho antes e após o pré-tratamento com ácido diluído (HCl 1% m/v). Observando o gráfico, nota-se que a biomassa *in natura* liberou mais açúcares redutores (AR) ao longo do tempo do que a pré-tratada com ácido, apresentando até 4 vezes mais produção de AR.

Figura 16 - Gráfico de comparação da hidrólise enzimática antes e após pré-tratamento.



Estudos realizados por Santos (2021), com o pré-tratamento do sabugo de milho com H_2SO_4 1% (m/v) a 100°C por 70 minutos, seguido de hidrólise enzimática utilizando complexo celulolítico produzido por *Penicillium* sp. FSDE 15 liofilizado, mostraram um teor máximo de AR de aproximadamente 23,07 g/L após 30 minutos de reação. No presente trabalho, a conversão máxima que a biomassa pré-tratada atingiu foi de 1,370 g/L em 130 minutos de reação. Nesse cenário, o baixo rendimento de açúcares redutores pode ser explicado pela utilização do extrato enzimático bruto, sem as etapas de concentração e liofilização, uma vez que essas etapas promoveram um aumento de 21 vezes na concentração enzimática em termos de quantificação de FPase, passando de 0,048 para 1,008 FPU/mL (Santos, 2021).

Por outro lado, a redução da sacarificação após o pré-tratamento e a produção linear de AR pode ter ocorrido devido à formação de inibidores durante a reação e/ou à exposição ineficaz da celulose. Como a granulometria do material não estava uniforme, a fração com menor tamanho de partícula foi hidrolisada rapidamente, enquanto a parte com maior granulometria apresentou maior resistência, uma vez que a adsorção das enzimas ao material pode ter sido impedida pela recalcitrância residual das partículas maiores. Além do mais, também pode ser explicado pela hidrólise da parte amorfa da biomassa com aumento da cristalinidade residual.

Nessas circunstâncias, Carvalho (2016) pré-tratou a biomassa de milho com ácido diluído (H_2SO_4 0,5%) a 121 ºC por 15 minutos e realizou a hidrólise enzimática da fração sólida com 20 FPU/mL de Cellic Ctec 2 a 50 ºC, obtendo que o melhor índice de ART (g/L) foi o da palha de milho com 5 g da biomassa após 48 horas de reação, com valor de 30,68 g/L.

4.5. Produção de etanol a partir da fermentação dos licores do pré-tratamento ácido e da hidrólise enzimática

Os dados apresentados na Tabela 7 exibem a quantificação de açúcares redutores (AR), sólidos solúveis totais (°Brix) e bioetanol obtidos a partir de diferentes frações de líquidos (original e lavagens) do pré-tratamento com ácido diluído da biomassa lignocelulósica e da hidrólise enzimática (HE) da biomassa *in natura*.

Tabela 7 - Resultados da fermentação.

	Original	**1ª lavagem**	**2ª lavagem**	**Após HE (sem pré-tratamento)**
AR (inicial)	0,286 ± 0,0015	6,771 ± 0,018	0,863 ± 0,014	4,801 ± 0,0040
AR (final)	0,140 ± 0,0025	3,189 ± 0,011	0,711 ± 0,034	2,146 ± 0,0087
°Brix inicial	6,5 ± 0,0	3,5 ± 0,14	0,5 ± 0,14	2,5 ± 0,14
°Brix (final)	5,5 ± 0,14	3,5 ± 0,14	0,5 ± 0,14	2,5 ± 0,14
Bioetanol (g/L)	0,074	1,828	0,078	1,354

No líquido original, a concentração inicial de AR foi (0,286 g/L), resultando em uma baixa produção de etanol (0,074 g/L), devido à presença de inibidores gerados durante o pré-tratamento, como furfural, HMF (5-hidroximetilfurfural) e ácidos orgânicos provenientes da degradação da hemicelulose, que prejudicam a eficiência da fermentação ao inibir a atividade das leveduras (Vaz *et al.*, 2017; Simões *et al.*, 2020). Na 2ª lavagem, a concentração de AR foi bem menor (0,863 g/L), com uma consequente redução na produção de etanol (0,078 g/L), indicando que poucos açúcares ainda estavam disponíveis.

Entretanto, na 1ª lavagem, houve uma liberação significativa de açúcares (6,771 g/L), o que levou a uma maior produção de etanol (1,828 g/L), mostrando que a maior parte dos açúcares fermentáveis foi extraída nessa etapa. Isso pode ser explicado pela utilização da prensa manual ao lavar o resíduo do pré-tratamento, pois quantidades significativas de açúcares fermentáveis podem ter sido liberadas durante o processo. Os valores encontrados podem ser comparados a resultados de outros trabalhos que relatam a eficiência do pré-tratamento ácido na solubilização de hemicelulose, liberando pentoses e hexoses rapidamente fermentáveis, como comprovado por Costa *et al.* (2021). Os valores de °Brix permaneceram relativamente constantes nas lavagens, evidenciando que parte dos sólidos solúveis não fermentáveis estava presente, contribuindo para os valores observados.

O caldo após hidrólise enzimática da biomassa de milho *in natura* resultou em uma concentração inicial de AR de 4,801 g/L. Após a fermentação, essa concentração foi reduzida para 2,146 g/L, indicando o consumo significativo de açúcares fermentáveis, como glicose e xilose. A produção de bioetanol atingiu 1,354 g/L, um valor menor que o da 1ª lavagem do pré-tratamento ácido, mas ainda relevante, considerando a ausência de

pré-tratamento na biomassa. O valor de °Brix permaneceu estável em 2,5, sugerindo a presença de compostos não fermentáveis no caldo.

De acordo com Bohn (2018), a fermentação do hidrolisado obtido nas etapas de pré-tratamento (0,2 g CaO/g de biomassa e 70 ºC) e hidrólise enzimática, utilizando-se enzimas comerciais nas concentrações de 2% Ctec2 (m/m) e 0,5% Htec2 (m/m), resultou em um rendimento de 0,376 g de etanol por grama de glicose, empregando uma levedura comercial e outra isolada a partir de biomassa em decomposição proveniente da biomassa de milho (caule, folha e palha).

Carvalho (2016) pré-tratou a biomassa de milho com ácido diluído (H_2SO_4 0,5%) a 121 ºC por 15 minutos, realizou a hidrólise enzimática da fração sólida com 20 FPU/mL de Cellic Ctec 2 a 50 ºC e fermentou o hidrolisado utilizando *S. cerevisiae* a 30 ºC, obtendo rendimentos acima de 90,97%, com uma concentração de cerca de 3,9 g/L para ambas as biomassas (palha e sabugo).

5 CONCLUSÕES

- Foi produzido o extrato enzimático bruto, alcançando uma atividade em CMCase de 78,320 U/g. As enzimas utilizadas no estudo não passaram por etapas de purificação ou concentração, e os valores obtidos refletem a qualidade das enzimas produzidas, demonstrando seu potencial na conversão da biomassa do pé de milho em etanol.
- A biomassa do pé de milho mostrou-se adequada para o processo de hidrólise enzimática, apresentando parâmetros semelhantes aos de outras biomassas utilizadas na produção de açúcares fermentescíveis, conforme relatado na literatura.
- A partir dos resultados do planejamento experimental e das análises estatísticas, concluiu-se que os valores ótimos de pH e temperatura para a realização do ensaio de hidrólise foram, respectivamente, 3,0 e 60 ºC. No entanto, é necessário realizar um ensaio de otimização.
- O ensaio de hidrólise enzimática demonstrou que as enzimas celulases são capazes de degradar a biomassa. No entanto, a biomassa necessita de um pré-tratamento mais eficaz, visto que o pré-tratamento utilizado não disponibilizou a celulose de maneira adequada para a adsorção das enzimas.

- Verificou-se que a utilização de fungos filamentosos, que geralmente não são usados comercialmente para a produção de celulases, representa uma nova alternativa para o aproveitamento integral do milharal após a colheita. Além disso, o pé de milho apresenta grande potencial para a produção de etanol de segunda geração.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, R.; SHAHEEN, N.; IQTEDAR, M.; NAZ, S.; IFTIKHAR, T. **Optimization of cultural conditions for the production of alpha amylase by Aspergillus niger (BTM-26) in solid state fermentation.** Pak. J. Bot., v. 46, n. 3, p. 1071–1078, 2014.

BAKSI, S. et al. **Efficacy of a novel sequential enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass and inhibition characteristics of monosugars.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 129, p. 634-644, 2019.

BARROS, B.; SCARMINIO, J. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1995, 480 p.

BOHN, L. R. **Produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica de milho.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó-SC, 2018.

CABIAC, A.; GUILLON, E.; CHAMBON, F.; PINEL, C.; RATABOUL, F.; ESSAYEM, N. **Cellulose reactivity and glycosidic bond cleavage in aqueous phase by catalytic and non catalytic transformations.** Applied Catalysis A: General, v. 402, p. 1, 2011.

CARVALHO, LÍVIA LUÍZA. **Estudo da hidrólise e resíduos de milho (Zea mays) para produção de etanol de segunda geração.** 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.

CASCIATORI, F. P. **Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido: ampliação de escala de biorreatores de leito fixo.** 2015. 176 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", São José do Rio Preto-SP, 2015.

CATELAN, T. C.; PINOTTI, L. M. **Avanço das pesquisas envolvendo Aspergillus niger e bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono visando à produção de celulases: Uma análise bibliométrica.** Revista Matéria, v.24, n.2, 2019.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: décimo sexto levantamento, safra 2023/2024.** Brasília, DF: Conab, 2024. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5478-safra-de-graos-2023-2024-esta-estimada-em-294-1-milhoes-de-toneladas>. Acesso em: 10 jul. 2024.

COSTA, B. E. B.; CRUZ, R. S.; RANGEL, F. C.; MENEGHETTI, S. M. P. **Comparação entre a hidrólise química e enzimática da biomassa lignocelulósica para a produção de bioetanol: uma revisão.** Revista Virtual de Química, 2021.

DARONCH et al. **Produção de celulase *por Penicillium sp*. utilizando resíduo agroindustrial em fermentação em estado sólido.** CONGRESSO BRASILEIRO DE

ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11., 2015, Campinas. Anais [...]. Blucher Proceedings, 2014.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; PAVANELLO, L. G.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; BONOMI, A. **Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane.** Applied Energy. v.109, p. 72-78, 2013. ISSN 0306-2619, https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.03.081.

EMBRAPA. **Fertilidade de solos: Adubação orgânica.** 2011. Brasília, DF: Embrapa, 2011. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMS/15589/1/Circ_22.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2024.

FARINAS, C. S. **Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector.** Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 52, p. 179-188, 2015.

FIGUEIREDO, P.; LINTINEN, K.; HIRVONEN, J. T.; KOSTIAINEN, M. A.; SANTOS, H. A. **Properties and chemical modifications of lignin: towards lignin-based nanomaterials.** Progress in Materials Science, v. 93, p. 233-269, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2017.12.001>.

GALBE, M. ZACCHI, G. **Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. Biomass Bioenergy** 46, 70–78, 2012.

GARCIA-GALINDO, I. et al. **New features and properties of microbial cellulases required for bioconversion of agro-industrial wastes.** Enzymes in Food Biotechnology, p. 535-550, 2019.

GOULD, K. **Corn stover harvesting.** *Cattle Call*, v. 12, p. 2-3, 2007. Disponível em: http://msue.anr.msu.edu/uploads/236/58572/CornStoverHarvesting.pdf. Acesso em: 07 set. 2024.

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

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

LI, Y. et al. **Economic viability and environmental impact investigation for the biofuel supply chain using co-fermentation technology.** Applied Energy, v. 259, p. 1-21, 2020.

LIMA, D. R. S. **Avaliação de rotas tecnológicas para o aproveitamento energético do bagaço de cana-de-açúcar.** 2018. 275 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

MAGALHÃES, P.; BORGHI, E.; KARAM, D.; PEREIRA FILHO, I.; RIOS, S.; ABREU, S.; LANDAU, E.; GUIMARÃES, L.; PASTINA, M.; DURÃES, F.

Desenvolvimento do milho segunda safra: fatores genético-fisiológicos, plataforma de conhecimento e práticas de manejo de cultivo e uso, visando sustentabilidade de produção e produtividade no binômio soja/milho. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2020.

MARTINS, Robson. **Otimização do método de extração de lignina de mandioca utilizando sistema acelerado por solvente (ASE).** 2018. 63 f. Monografia - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

MELATI, R. B.; SHMATZ, A.; NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol e obtenção de xilooligômeros.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2017.

MÉLO, BEATRIZ CAVALCANTI AMORIM DE. **Produção de celulases por fermentação em estado sólido em resíduo de acerola (Malpighia sp.) utilizando *Trichoderma reesei***. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) — Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MENEGUETTI, C. C., MEZAROBA, S., GROFF, A. M. **Processos de produção de álcool etílico de cana-de-açúcar e os possíveis aproveitamento dos resíduos resultantes do sistema.** Em: IV Encontro de Engenharia de Produção Agroindustrial. Campo Mourão – PR, 2010.

MITRI, S. et al. **Valorization of brewers' spent grains: pretreatments and fermentation, a review. Fermentation,** v. 8, n. 50, p. 1-14, 2022.

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

MORAIS, J. Saraiva; R.; MARCONCINI, J. **Procedimentos para análise lignocelulósica.** Campina Grande, PB: Embrapa, 2010.

NUNES et al. **Resíduos agroindustriais: potencial de produção de etanol de segunda geração no Brasil.** Revista Liberato, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

OLIVEIRA, Carolina Zanini. **Utilização do bagaço do malte para obtenção de enzimas amilolíticas por fermentação em estado sólido. 2017.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

PAGNOCCA, F. C.; CONTIERO, J.; BRIENZO, M. **Sugarcane bagasse: production, composition, properties, and feedstock potential.** In: Rachel Murphy (Org.). Sugarcane: production systems, uses and economic importance. 1. ed. Nova York: Nova Science Publishers, 2017. p. 1-38.

PINHEIRO, Layla Uliana. **Análise de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica para produção de biogás utilizando hidrólise ácida e básica.** Instituto Federal do Espírito Santo, 2022.

RODRIGUES, Cristine; WOICIECHOWSKI, Adenise Lorenci; JUNIOR, Luiz Alberto Letti. **Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial.** [S. l.: s. n.], cap. 8, p. 284-314, 2017.

RODRIGUES, M. L. F. et al. **Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium sp.* isolado das folhas de Ricinus communis L**. Revista Brasileira de Energias Renováveis, v. 4, p. 129-145, 2015.

SALOMÃO, G. S. B. et al. **Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 17, p. 1-6, 2018.

SANTOS, F. A. **Produção de celulases por *Penicillium* sp. FSDE15 e hidrólise enzimática do sabugo de milho.** Dissertação (mestrado em Engenharia Química). UFPB – João Pessoa, 2021.

SANTOS et al. **Produção de celulases estáveis a temperatura e pH a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira**. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20, 2014, Florianópolis. Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Blucher Proceedings, 2014.

SILVA, G. M. **Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar com amônia aquosa para produção de etanol.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2011.

SIMÕES, A. L. G. et al. **Pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para a otimização da produção de biogás.** In: 3º ConReSol, [s.l.], 2020.

SOUTO, L. R. F. et al. **Utilization of residue from cassava starch processing for production of fermentable sugar by enzymatic hydrolysis.** Food Science and Technology, v. 37, n. 1, p. 19-24, 2017.

SHEEHAN, J.; ADEN, A.; PAUSTIAN, K.; KILLIAN, K.; BRENNER, J.; WALSH, M.; NELSON, R. **Energy and environmental aspects of using corn stover for fuel ethanol**. *Journal of Industrial Ecology*, v. 7, p. 117-146, 2017.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGAO, F. A. S. de. **Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5 dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos.** Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 87, atualização 2017.

VAZ JR, S.; SANTORO, D. C. J.; NASCIMENTO, V. M.; RABELO, S. C. **Pré-tratamento com ácido diluído do bagaço de cana-de-açúcar para a máxima recuperação de xilose.** Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2017.

VIIKARI, L.; VEHMAANPERÄ, J.; KOIVULA, A. **Lignocellulosic ethanol: from science to industry**. Biomass and Bioenergy, v. 46, p. 13, 2012.