

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE

CAMPUS CASCAVEL

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA:

RECURSOS HÍDRICOS E SANEAMENTO AMBIENTAL

**APROVEITAMENTO DAS FRAÇÕES HEMICELULÓSICA E CELULÓSICA DOS
RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO GIRASSOL PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

DANIELLE CAMARGO

CASCAVEL

FEVEREIRO - 2012

DANIELLE CAMARGO

**APROVEITAMENTO DAS FRAÇÕES HEMICELULÓSICA E CELULÓSICA DOS
RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO GIRASSOL PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação *Stricto sensu* de Engenharia Agrícola, em requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, na área de concentração Saneamento Ambiental, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* Cascavel

Orientadora: Professora Dr^a. Luciane Sene
Co-Orientadora: Professora Dr^a. Simone Damasceno Gomes

CASCABEL

FEVEREIRO – 2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Biblioteca Central do Campus de Cascavel – Unioeste

Ficha catalográfica elaborada por Jeanine da Silva Barros CRB-9/1362

C176a Camargo, Danielle
Aproveitamento das frações hemicelulósica e celulósica dos resíduos do processamento do girassol para produção de bioetanol. / Danielle Camargo — Cascavel, PR: UNIOESTE, 2012.
92 f. ; 30 cm.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciane Sene
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Damasceno Gomes
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas.
Bibliografia.

1. Bioetanol. 2. Girassol - Processamento. 3. *Helianthus annuus*. 4. Resíduo lignocelulósico. 5. *Pichia stipitis*. 6. *Kluyveromyces marxianus*. 7. Etanol. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21. ed. 662.8

Ana Maria Martins Alves Vasconcelos: revisora de português, normas de elaboração e inglês;

Data de revisão de português, normas e inglês: 22/04/2012.

DANIELLE CAMARGO

**“Aproveitamento das Frações Hemicelulósica e Celulósica dos Resíduos do
Processamento do Girassol para Produção Bioetanol”**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola, em cumprimento parcial dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, para aprovação pela seguinte banca examinadora:

Orientadora: Profª Drª Luciane Sene

Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, UNIOESTE – Cascavel - PR

Profª Drª Simone Damasceno Gomes

Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, UNIOESTE – Cascavel - PR

Profª Drª Sílvia Renata Machado Coelho

Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, UNIOESTE – Cascavel - PR

Profª Drª Maria das Graças de Almeida Felipe

Departamento de Microbiologia Aplicada e Conversão de Biomassa - EEL-
USP –Lorena – SP

**CASCADEL
FEVEREIRO – 2012**

BIOGRAFIA

Danielle Camargo, nascida no dia 21 de novembro de 1984, natural de Cascavel no Paraná. Coursou os ensinamentos fundamental e médio em colégios públicos na mesma cidade. No ano de 2003, ingressou na Universidade Paranaense, no Curso de Licenciatura e Bacharelado de Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia, o qual concluiu no ano de 2006. Durante o período de graduação, participou de Programa de Iniciação Científica (PIC) com o Projeto de Pesquisa Intitulado “Efeito alelopático e atividade antimicrobiana de plantas medicinais - Parte I” e também participou do Projeto Recanto das Plantas - Horto medicinal. Qualificou-se como Técnica em Meio Ambiente pelo Centro de Educação profissional Pedro Boaretto Neto. No ano de 2008, ingressou no Curso de Pós-graduação Lato Sensu em Biotecnologia na Universidade do Oeste do Paraná (UNIOESTE); neste período foi representante discente da pós-graduação junto ao colegiado. Foi atuante na licenciatura pela Secretaria de Estado da Educação do Paraná, ministrando as disciplinas de Química, Ciências e Biologia para os ensinamentos fundamental e médio. Atualmente, é discente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola da UNIOESTE, nível mestrado, na área de concentração de Saneamento Ambiental, no qual participa do projeto “Aproveitamento da fração hemicelulósica e celulósica do resíduo do processamento do girassol para produção biotecnológica do etanol”, financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e é bolsista pela Fundação Parque Tecnológico Itaipu (PTI).

“Que o sucesso do futuro seja
baseado no conhecimento do nosso
passado”.

Kiichiro Toyoda

Dedico este trabalho, assim como todas as minhas conquistas, à minha família, principalmente ao meu amado marido, Jairo Patrício Paulino, e aos meus pais, Antonio Dirceu e Maria Glaci, por todo amor, carinho, compreensão e apoio confiados a mim.

AGRADECIMENTOS

Expresso reconhecimento a todos que me apoiaram e incentivaram para que este sonho se tornasse realidade, de modo especial agradeço:

Primeiramente a Deus, por todas as suas bênçãos, graças, proteção e capacidade concebidas a mim, para que eu conseguisse cumprir mais esta etapa em minha vida;

À professora Dr^a Luciane Sene, pela orientação, amizade, assistência, atenção, contribuição e principalmente pela confiança durante o desenvolvimento do trabalho;

Ao meu pai, Dirceu, à minha mãe, Glaci, e meu marido, Jairo, pela compreensão e incentivo;

Às queridas amigas e colaboradoras Isamara e Joana, pelo auxílio em alguns experimentos. Além disso, por todas as conversas e os momentos compartilhados em laboratório;

A todos os colegas de pós-graduação, pela convivência durante as atividades realizadas;

A todos os professores do Programa de pós-graduação que contribuíram para o meu aprendizado, em particular às professoras Dr^a Silvia e Dr^a Simone durante o uso do HPLC;

Aos funcionários da UNIOESTE;

À Escola de Engenharia de Lorena EEL-USP, pela realização das análises de furfural e hidroximetilfurfural;

Aos órgãos de fomento, Parque Tecnológico Itaipu (PTI) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo apoio financeiro;

Enfim, expresso reconhecimento a todos que contribuíram para realização deste trabalho.

APROVEITAMENTO DAS FRAÇÕES HEMICELULÓSICA E CELULÓSICA DO RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DO GIRASSOL PARA PRODUÇÃO BIOETANOL

RESUMO

Pesquisas sobre o etanol de segunda geração, produzido a partir dos resíduos agroindustriais, têm recebido atenção especial como possível solução para contribuir na sustentabilidade energética. Tal obtenção consiste na conversão das fibras lignocelulósicas (celulose e hemicelulose) que, após passarem por pré-tratamento específico e hidrólise, originam açúcares fermentescíveis, que são biotransformados a etanol de segunda geração. Por sua vez, o setor de extração de óleo, a partir da semente de girassol, gera resíduos lignocelulósicos, conhecidos como torta e farelo de girassol, que podem ser fontes para a reciclagem e alternativa de lucro a partir da conversão biotecnológica em produtos de interesse comercial. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de etanol a partir das frações hemicelulósica e celulósica da torta ou farelo, provenientes do processamento das sementes de girassol (*Hellianthus annuus*). Após a caracterização da quantidade de celulose, hemicelulose e lignina dos resíduos, os mesmos foram submetidos à hidrólise ácida branda com ácido sulfúrico, com variações na concentração de H₂SO₄ (1; 2; 4; 6 % v/v) e tempo de hidrólise em autoclave (20, 40 e 60 minutos). Após a escolha do farelo de girassol como melhor resíduo e do melhor tratamento para obtenção do hidrolisado hemicelulósico com alto teor de xilose e baixo teor de compostos inibidores, o hidrolisado foi destoxificado e fermentado pela levedura *Pichia stipitis* ATCC 58376 a 30 °C com variações na agitação (100, 150 e 200 rpm). Para obtenção do etanol proveniente da fração celulósica, a biomassa sólida restante do tratamento de hidrólise ácida foi deslignificada com 1% NaOH e submetida ao processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 a 38 °C, 150 rpm, com variações na concentração das enzimas (10; 15 e 20 FPU/g de Cellulase complex NS22086 e 1/3; 1,5/3 e 2/3 de β - glicosidase NS22118 em relação à celulase), ambas do Novozymes Cellulosic Ethanol Enzyme' Kit. A torta apresentou 27,5; 33,16 e 32,18% de celulose, hemicelulose e lignina respectivamente, enquanto o farelo apresentou 32,93; 30,90 e 26,62% celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente. O tratamento do farelo de girassol com 6% de H₂SO₄ e 20 minutos de hidrólise resultou em um hidrolisado hemicelulósico com elevadas concentrações de açúcares (24,88 g/L xilose; 22,33 g/L glicose e 8,9 g/L arabinose) e menores quantidades de compostos tóxicos (1,59 g/L fenóis; 1,93 g/L ácido acético, 0,0182 g/L furfural e 0,0514 g/L hidroximetilfurfural). A agitação influenciou no processo de produção de etanol por *P. stipitis* no hidrolisado hemicelulósico, cujos melhores resultados (etanol 8,8 g/L; rendimento 0,23 g/g e produtividade 0,12 g/L.h) foram encontrados com a agitação de 200 rpm. No processo SSF, as melhores condições para produção de etanol foram 20 FPU/g de celulase e 15 CBU β-glicosidase, resultando em 27,88 g/L etanol, rendimento 0,35 g/g e produtividade 0,38 g/L.h. Nessa mesma condição, foi verificada a melhor porcentagem na eficiência de conversão enzimática - ECC (21,95%). Os resultados são promissores e demonstram que o farelo de girassol é adequado para a produção de etanol de segunda geração tanto a partir da hemicelulose como de celulose.

Palavras-chave: *Hellianthus annuus*, resíduo lignocelulósico, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, etanol.

UTILIZATION OF HEMICELLULOSIC AND CELLULOSIC FRACTIONS OF WASTE FROM SUNFLOWER PROCESSING FOR BIOETHANOL PRODUCTION

ABSTRACT

The researches on second generation ethanol, produced by agroindustrial wastes, have demanded special attention as a possible solution that can contribute to energy sustainability. Such production is based on lignocellulosic fiber conversion (cellulose and hemicellulose), which generates fermentable sugars that are biotransformed in bioethanol after some specific pretreatment and hydrolysis. The industries of extracting oil from sunflower seeds have also generated lignocellulosic residues known as sunflower cake and bran. They can be sources for recycling and profitable alternatives on converting biotechnological products with some trading interest. Thus, this trial aimed at evaluating ethanol production from cellulose and hemicellulose fractions of cake and bran, from the processing of sunflower seeds (*Helianthus annuus*). After the description concerning contents of cellulose, hemicellulose and lignin, the residues were submitted to a mild acid hydrolysis with sulfuric acid, whose concentration of H₂SO₄ varied in 1, 2, 4 and 6% v/v, while times of hydrolysis in autoclave were (20, 40 and 60 minutes). After choosing the best of sunflower residue and treatment to obtain a hemicellulosic hydrolysate with high content of xylose and low content of inhibiting compounds, the detoxified hydrolyzate was fermented by the yeast *Pichia stipitis* ATCC 58376 at 30 °C with some stirring variations (100, 150 and 200 rpm). In order to obtain ethanol from cellulosic fraction, the remaining solid biomass from acid hydrolysis treatment was delignified at 1% NaOH and submitted to simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) by yeast *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, at 38 °C and 150 rpm. The enzymes concentrations varied at 10, 15 and 20 FPU/g of Cellulase complex NS22086 and 1/3, 1.5/3 and 2/3 of β-glucosidase in relation to NS22118 cellulase, both ones from "Novozymes Cellulosic Ethanol Enzyme Kit ". Regarding chemical composition, the cake has shown the following answers: 27.5, 33.16 and 32.18% of cellulose, hemicellulose and lignin, respectively, while for bran, the answers were: 32.93, 30.90 and 26.62% cellulose, hemicellulose and lignin, respectively. Treatment of sunflower bran with 6% H₂SO₄ and 20 minutes of hydrolysis resulted in a hemicellulosic hydrolysate with high concentrations of sugars (24.88 g/L xylose, 22.33 g/L glucose, 8.9 g/L arabinose and lower amounts of toxic compounds (1.59 g/L phenol, 1.93 g/L acetic acid, 0.0182 g/L furfural and 0.0514 g/L hydroxymethylfurfural). The stirring influenced the process of ethanol production by *P. stipitis* in hemicellulosic hydrolyzate, whose best results (ethanol 8.8 g/L, yield 0.23 g/g and productivity 0.12 g/Lh) were with 200 rpm stirring. In relation to the SSF process, the best conditions for ethanol production were 20 FPU/g cellulase and 15 CBU β-glucosidase. This resulted in 27.88 g/L ethanol, 0.35 g/g yield and 0.38 g/Lh productivity. In the same condition, the best efficiency of enzymatic conversion (EEC) was 21.95%. These are promising results since sunflower bran is available to produce second generation ethanol from both xylose and cellulose.

Keywords: *Helianthus annuus*, lignocellulosic waste, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, ethanol.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELA.....	X
LISTA DE FIGURA.....	Xii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	03
2.1 Geral	03
2.2 Específicos.....	03
3 REVISÃO DE LITERATURA	04
3.1 Cultura de girassol.....	04
3.2 Potencial dos resíduos lignocelulósicos.....	06
3.3 Etapas de produção de etanol a partir dos materiais lignocelulósicos.....	08
3.3. Etapas de produção de etanol a partir da fração celulósica.....	09
3.3.2 Etapas de produção de etanol a partir da fração hemicelulósica.....	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 Biomassa proveniente do processamento das sementes de girassol.....	16
4.2 Análise da composição química da matéria-prima.....	16
4.2.1 Determinação do teor de lignina insolúvel	17
4.2.2 Determinação do teor de cinzas da lignina.....	17
4.2.3 Determinação de lignina solúvel.....	18
4.2.4 Determinação do teor de cinzas totais.....	19
4.2.5 Determinação de lipídios.....	19
4.3 Avaliação das condições de hidrólise da fração hemicelulósica.....	19
4.4 Tratamento do hidrolisado hemicelulósico do farelo.....	20
4.5 Determinação da recuperação de pentoses do hidrolisado hemicelulósico.....	20
4.6 Deslignificação do resíduo sólido do farelo de girassol.....	21
4.7 Fermentações.....	22
4.7.1. Microrganismos.....	22
4.7.2 Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol por <i>P. stipitis</i>	23
4.7.3. Sacarificação simultânea à fermentação da biomassa proveniente do farelo de girassol com <i>K. marxianus</i>	23
4.8 Determinação da concentração de fenóis.....	24
4.9 Determinação da concentração de açúcares, ácido acético, xilitol, glicerol e etanol.....	25
4.10 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural.....	25
4.11 Determinação da concentração celular.....	25

4.12 Determinação do pH	26
4.13 Determinação da concentração de sólidos solúveis (Brix).....	26
4.14 Determinação da atividade enzimática.....	26
4.15 Cálculos dos parâmetros fermentativos.....	26
4.15.1 Fator de conversão de glicose e xilose em etanol ($Y_{P/S}$).....	26
4.15.2 Fator de conversão de glicose e xilose em células ($Y_{X/S}$).....	27
4.15.3 Produtividade volumétrica em etanol (Q_p).....	27
4.15.4 Fator de conversão da celulose em etanol ($Y_{E/C}$).....	27
4.15.5 Máximo teórico em etanol (%).....	28
4.15.6 Conversão enzimática da celulose.....	28
4.16 Planejamento estatístico.....	28
4.17 Esquema geral da metodologia empregada nos experimentos.....	28
5 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	30
5.1 Análise da composição química da matéria prima.....	30
5.2 Avaliação das condições de hidrólise da fração hemicelulósica.....	32
5.2.1 Concentração de pH, açúcares e sólidos solúveis formados durante a hidrólise ácida da fração hemicelulósica.....	32
5.2.2 Compostos tóxicos formados durante a hidrólise ácida da fração hemicelulósica.....	36
5.2.3 Caracterização química da porção sólida residual.....	39
5.2.4 Determinação da recuperação das pentoses.....	41
5.3 Tratamento do hidrolisado hemicelulósico do farelo.....	42
5.4 Deslignificação da fração celulósica.....	44
5.5 Fermentação do hidrolisado hemicelulósico por <i>P. stipitis</i>	45
5.5.1 Crescimento celular.....	45
5.5.2 Variação do pH.....	46
5.5.3 Variação de concentração de açúcares e produção de etanol.....	47
5.5.4 Parâmetros fermentativos da produção de etanol.....	50
5.5.5 Variação na concentração de ácido acético e produção de glicerol, xilitol.....	51
5.6 Sacarificação simultânea à fermentação com <i>K. marxianus</i>	54
5.6.1 Crescimento celular.....	54
5.6.2 Variação do pH.....	56
5.6.3 Variação da concentração de açúcares e produção de etanol.....	57
5.6.4 Parâmetros fermentativos da produção de etanol.....	61
5.6.5 Formação de subprodutos.....	63
6 CONCLUSÕES	65
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
8 REFÊRENCIAS.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Matriz do planejamento dos experimentos com 10; 15 e 20 FPU/g da Celulase NS 22086 e 1/3; 1,5/3 e 2/3 de β - glicosidase NS22118 para a sacarificação simultânea à fermentação do resíduo do farelo de girassol empregando <i>K.marxianus</i> ATCC 36907.....	24
Tabela 2 Resultados da caracterização química (b/s) quanto ao teor de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e lipídios da torta e do farelo de girassol.....	30
Tabela 3 Valores de pH e concentração de D-xilose, D-glicose, L-arabinose e sólidos solúveis nos hidrolisados hemicelulósicos de torta de girassol em função da variação da concentração de ácido sulfúrico e do tempo de hidrólise.....	32
Tabela 4 Valores de pH e concentração de D-xilose, D-glicose, L-arabinose e sólidos solúveis nos hidrolisados hemicelulósicos de farelo de girassol em função da variação da concentração de ácido sulfúrico e do tempo de hidrólise.....	33
Tabela 5 Concentração de fenóis, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) nos hidrolisados hemicelulósicos de torta de girassol em função da variação da concentração de ácido sulfúrico e do tempo de hidrólise.....	36
Tabela 6 Concentração de fenóis, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) nos hidrolisados hemicelulósicos de farelo de girassol em função da variação da concentração do ácido sulfúrico e do tempo de hidrólise.....	37
Tabela 7 Teores de celulose, hemicelulose, lignina na biomassa sólida residual da torta de girassol após a hidrólise ácida com variação da concentração de ácido sulfúrico e do tempo de hidrólise	40
Tabela 8 Teores de celulose, hemicelulose, lignina na biomassa sólida residual de farelo de girassol após a hidrólise ácida com variação da concentração de ácido sulfúrico e do tempo de hidrólise.....	41
Tabela 9 Concentração de D-xilose, D-glicose, L-arabinose, fenóis, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol “in natura” e destoxificado obtido por hidrólise ácida empregando 6% H ₂ SO ₄ por	

20 minutos.....	43
Tabela 10 Teores de celulose, hemicelulose, lignina na biomassa sólida residual de farelo de girassol após remoção da hemicelulose através da variação da concentração de ácido sulfúrico e do tempo de hidrólise e posterior a deslignificação.....	44
Tabela 11 Parâmetros fermentativos finais da produção de etanol pela levedura <i>P. stipitis</i> ATCC 58376 durante cultivo no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol sob agitação de 100, 150 e 200 rpm.....	51
Tabela 12 Parâmetros fermentativos finais da produção de etanol nos experimentos de SSF com <i>K.marxianus</i> ATCC 36907 e biomassa do farelo de girassol com 10; 15 e 20 FPU.g⁻¹ de Celulase NS 22086 e 1/3; 1,5/3 e 2/3 de β - glicosidase NS22118.....	62
Tabela 13 Variação da concentração de glicerol para os tempos de 12, 24, 48 e 72 horas e concentração de xilitol em 72 horas nos experimentos de SSF com <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 e biomassa do farelo de girassol.....	64

LISTA DE FIGURAS




Figura 1 Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico....	06
Figura 2 Modelo esquemático da lignina proposto por Adler (1977).....	07
Figura 3 Representação da cadeia linear da celulose, com as unidades de glicose unidas por ligações β -1 \rightarrow 4.....	08
Figura 4 Esquema da produção de etanol a partir das frações celulósica e hemicelulósica de biomassa vegetal.....	09
Figura 5 Representação do efeito do pré-tratamento na fibra lignocelulósica.....	10
Figura 6 Representação do esquema da sacarificação em separado e simultânea à fermentação	12
Figura 7 Esquema da utilização da xilose por leveduras.....	15
Figura 8 Aspecto da torta e farelo após trituração e secagem	16
Figura 09 Fotografia de células de <i>P. stipitis</i> sem coloração (a) fotografia de células de <i>P. stipitis</i> coradas com corante fluorescente DAPI (b) ambas com aumento de 800x.....	22
Figura 10 Fotografia de células de <i>K. marxianus</i> sem coloração (aumento de 1000x).....	22
Figura 11 Esquema geral da metodologia utilizada nos experimentos para seleção do resíduo e produção de bioetanol.....	29
Figura 12 Comparação entre a porcentagem de recuperação de pentoses entre os diferentes tratamentos de hidrólise ácida da torta e do farelo de girassol.....	42
Figura 13 Concentração celular da levedura <i>P. stipitis</i> ATCC 58376 durante cultivo no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol sob agitação de 100 (), 150 () e 200 () rpm.....	46

Figura 14 Variação do pH durante o cultivo de <i>P. stipitis</i> ATCC 58376 no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol, sob agitação de 100 (▲), 150 (●) e 200 (■) rpm.....	47
Figura 15 Variação da concentração de xilose (■) e glicose (●) e produção de etanol (▲) durante o cultivo de <i>P. stipitis</i> ATCC 58376 no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol, sob agitação de 100 rpm.....	48
Figura 16 Variação da concentração de xilose (■) e glicose (●) e produção de etanol (▲) durante o cultivo de <i>P. stipitis</i> ATCC 58376 no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol, sob agitação de 150 rpm.....	48
Figura 17 Variação da concentração de xilose (■) e glicose (●) e produção de etanol (▲) durante o cultivo de <i>P. stipitis</i> ATCC 58376 no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol, sob agitação de 200 rpm.....	49
Figura 18 Variação da concentração de ácido acético durante o cultivo de <i>P. stipitis</i> ATCC 58376 no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol, sob agitação de 100 (▲), 150 (●) e 200 (■) rpm.....	52
Figura 19 Variação da concentração de glicerol durante o cultivo de <i>P. stipitis</i> ATCC 58376 no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol, sob agitação de 100 (▲), 150 (●) e 200 (■) rpm.....	53
Figura 20 Variação da concentração de xilitol durante o cultivo de <i>P. stipitis</i> ATCC 58376 no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol, sob agitação de 100 (▲), 150 (●) e 200 (■) rpm.....	54
Figura 21 Concentração celular final de <i>K.marxianus</i> ATCC 36907 nos experimentos de SSF com biomassa do farelo de girassol com diferentes concentrações de celulase (FPU.g ⁻¹) e de β-glicosidase (CBU.g ⁻¹).....	55
Figura 22 Valores de pH final (72 horas) nos experimentos de SSF com <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 e biomassa do farelo de girassol com diferentes concentrações de celulase (FPU.g ⁻¹) e de β-glicosidase (CBU.g ⁻¹).....	56

Figura 23 Variação da concentração de celobiose nos experimentos de SSF com *K. marxianus* ATCC 36907 e biomassa do farelo de girassol com diferentes concentrações de celulase NS22086 (FPU.g⁻¹) e de β-glicosidase NS22118 (CBU.g⁻¹), experimento 1 (—◆—); 2 (—■—); 3 (—▲—), 4 (··◆··), 5 (··■··), 6 (··▲··), 7 (—◆—), 8 (—■—), 9 (—▲—)..... 57

Figura 24 Variação da concentração de glicose nos experimentos de SSF com *K. marxianus* ATCC 36907 e biomassa do farelo de girassol com diferentes concentrações de celulase NS22086 (FPU.g⁻¹) e de β-glicosidase NS22118 (CBU.g⁻¹), experimento 1 (—◆—); 2 (—■—); 3 (—▲—), 4 (··◆··), 5 (··■··), 6 (··▲··), 7 (—◆—), 8 (—■—), 9 (—▲—)..... 59

Figura 25 Variação da concentração de etanol nos experimentos de SSF com *K. marxianus* ATCC 36907 e biomassa do farelo de girassol com diferentes concentrações de celulase NS22086 (FPU.g⁻¹) e de β-glicosidase NS22118 (CBU.g⁻¹), experimento 1 (—◆—); 2 (—■—); 3 (—▲—), 4 (··◆··), 5 (··■··), 6 (··▲··), 7 (—◆—), 8 (—■—), 9 (—▲—)..... 60

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional mundial se intensificou nos dois últimos séculos e chegou ao patamar atual de 7 bilhões de indivíduos. Aliado ao aumento demográfico houve a expansão da demanda por bens de consumo e energia, cujo efeito combinado ampliou a exploração dos recursos naturais, o qual ultrapassou sua capacidade suporte de equilíbrio e resulta em problemas ambientais cada vez mais notórios aos ecossistemas.

A produção de energia recebe destaque entre as práticas potencialmente poluidoras, como o setor que mais emite gases poluentes, principalmente na queima de combustíveis fósseis, portanto, contribui de maneira direta com o efeito estufa, mudanças climáticas, aquecimento global e destruição da camada de ozônio. O Brasil, em contrapartida, tem sido destaque na contribuição para a redução quanto ao lançamento desses gases, tornando-se modelo a ser seguido por outras nações, por possuir sua matriz baseada principalmente em energia renovável, de forma especial, sendo líder na produção de etanol a partir de cana-de-açúcar. Hoje, toda a síntese se baseia nas chamadas tecnologias de primeira geração, ou seja, a produção direta de etanol derivado da sacarose.

Para suprir a demanda crescente desse biocombustível, é necessária a busca por novas fontes de matérias-primas renováveis e tecnologias emergentes. Nesse sentido, atualmente, pesquisas com etanol de segunda geração demonstram ser uma possibilidade atraente para aumentar ainda mais a quantidade produzida e os rendimentos sem precisar ampliar áreas agriculturáveis, assim, os problemas ambientais e a competição com os alimentos são reduzidos.

Esse procedimento baseia-se no reaproveitamento dos materiais lignocelulósicos provenientes de resíduos agroindustriais vegetais, haja vista a ampla disponibilidade de fontes e quantidades produzidas anualmente. Os materiais lignocelulósicos são constituídos basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, cuja hidrólise resulta no rompimento das fibras, gerando açúcares de menor massa molar que podem ser substrato adequado para fermentações e bioprodução de etanol de segunda geração.

A utilização de todos os polissacarídeos presentes na fibra lignocelulósica é ressaltada para a viabilidade econômica da produção de etanol e sua comercialização, bem como estratégias para a otimização do processo. Tal fato agrega valor aos resíduos agroindustriais e o torna competitivo no mercado.

O processo de hidrólise por via química, na qual se utiliza ácido diluído, é a técnica comumente empregada em pesquisas para a transformação da fração hemicelulósica em hidrolisado rico em pentoses, principalmente xilose e arabinose. A produção de etanol a partir dos açúcares presentes no hidrolisado pode ser realizada com êxito pela fermentação

com *Pichia stipitis*, a qual se destaca como uma das poucas leveduras capazes de produzir esse bicomcombustível a partir de monômeros de cinco carbonos.

A transformação da fração celulose em glicose é comumente realizada através reações catalisadas pelo complexo enzimático denominado de celulasas. Nesse procedimento, os melhores rendimentos são alcançados quando a hidrólise e a fermentação acontecem concomitantemente, ou seja, a sacarificação simultânea à fermentação (SSF), pois o acúmulo de açúcar no biorreator é minimizado e há o aumento da conversão enzimática. Por outro lado, a condução desse processo requer estudos avançados, principalmente no que diz respeito às leveduras termotolerantes, capazes de suportar temperaturas próximas a 50 °C, faixa otimizada para atuação das celulasas. As linhagens de *Kluyveromyces* demonstram boas alternativas na conversão da celulose em etanol ao mesmo tempo em que suportam altas temperaturas.

Entre a extensa diversidade de biomassas vegetais, o girassol é uma das culturas que está em destaque nos últimos anos, principalmente para extração do óleo a partir das sementes. Grande parte da sua produção é destinada à fabricação de óleo comestível, porém, para atender à demanda energética do futuro, tem sido empregada como matéria-prima para fabricação do biodiesel. Na etapa final do processamento de extração do óleo, originam-se subprodutos denominados de torta e farelo, com alto teor de matéria orgânica celulósica e hemicelulósica, que poderão contribuir como uma matéria-prima de baixo custo para bioprocessos, os quais geram produtos com alto valor agregado, como o etanol.

Diante dessas considerações e pela escassez de estudos sobre o aproveitamento dos subprodutos do processamento do girassol para a produção de etanol, teve-se como objetivo estudar a utilização das frações hemicelulósica e celulósica desses subprodutos para a produção de etanol de segunda geração.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

- Investigar a viabilidade de bioconversão das frações celulósica e hemicelulósica provenientes dos subprodutos do processamento das sementes de girassol em etanol.

2.2 Específicos:

- Determinar a composição química da torta e do farelo de girassol;
- Testar diferentes condições de hidrólise ácida diluída por meio da variação do tempo e da concentração de ácido para obtenção do hidrolisado hemicelulósico com alto teor de xilose e baixa concentração de inibidores para a produção etanol por *P. stiptis*;
- Determinar as condições de agitação do hidrolisado hemicelulósico para o favorecimento dos rendimentos em etanol por *P. stiptis*;
- Caracterizar as frações sólidas restantes após os diferentes pré-tratamentos, de forma a selecionar o material com alto teor de celulose e os baixos teores de hemicelulose e lignina;
- Avaliar a hidrólise enzimática da fração celulósica simultânea à fermentação (SSF) para a obtenção de etanol por *K. marxianus*;
- Determinar os parâmetros de produção do processo de fermentação alcoólica (concentração final, rendimento e produtividade em etanol) tanto a partir de xilose quanto de glicose.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cultura de girassol

O girassol (*Helianthus annuus L.*) é uma dicotiledônea anual pertencente à família *Asteraceae*, ou ainda conhecida como família das *Compositae* (LENTZ et al., 2008). Sua origem ocorreu no continente Norte-americano, onde era admirada como uma planta ornamental. Atualmente, é cultivado em todos os continentes, com mais de 20 milhões de hectares e seus principais produtores são Rússia, Argentina e França (AGUIAR et al., 2001). No Brasil, é cultivado principalmente nos Estados de Goiás, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, São Paulo, Minas Gerais e Paraná (BRIGHENTI et al., 2004). Mundialmente, destaca-se como a quinta oleaginosa em produção de grãos; quarta em produção de farelo e terceira em produção de óleo (SANTOS et al., 2012). No Brasil, em 2011, foram produzidas 78,9 mil toneladas correspondendo a uma área total plantada de 61.630 hectares (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011).

Segundo Borsuk (2008), a utilização da cultura de girassol vem ganhando espaço como uma boa alternativa agrônômica em relação aos cultivos tradicionais de grãos, pois reduz as plantas indesejáveis, melhora a qualidade, fertilidade e ecologia do solo, se adapta às variadas condições de temperatura; é menos exigente em insumos e há possibilidade de inserção de duas safras na mesma área em sistemas de rotação e sucessão de culturas.

Aproximadamente 90% da produção mundial de suas sementes se destinam à elaboração de óleo e os 10% restantes à alimentação de pássaros e ao consumo humano direto (ROSSI, 1998). As sementes ainda se caracterizam por possuir elevado valor nutritivo, desde sua utilização como alimento *in natura* ou na forma de produtos transformados em gêneros alimentícios como o óleo (BALALIC; CRONOBARAC; MIKLIC, 2010).

Dois processos de extração do óleo de girassol são atualmente empregados. O processo de caráter industrial e mais amplamente usado, no qual se utiliza solvente (hexano), contudo, gera um resíduo com teor de óleo bastante inferior, na ordem de 1,5%. Isso resulta em maior proteína bruta (VAN CLEEF, 2008) e permite o uso do mesmo em rações como fonte de proteína e aminoácidos (FURLAN, MANTOVANI, MURAKAMI 2001). No entanto, a composição, tamanho e geometria das sementes, temperatura do solvente, além do pré-tratamento aplicado que altera a estrutura celular são características que influenciam no processo de extração e no resultado físico-químico final do farelo (PEREZ; CARELLI; CAPRISTE, 2011).

Já o processo mecânico de extração do óleo a partir de prensas é caracterizado pela menor eficiência e gera um produto denominado de torta, com média de 18% de gordura na

matéria seca (SOUZA et al., 2009). Apesar de ser menos eficiente na retirada da fração lipídica, a extração por prensa constitui o sistema mais viável em pequena escala, por não depender das exigências de instalações e segurança inerentes ao processamento com uso do solvente (Souza et al., 2009). Segundo Oliveira et al., (2007), assim como o farelo, a torta apresenta-se rica em proteína (até 30%), cálcio e fósforo, além de ter elevado teor de fibra.

Em média, para produzir uma tonelada de óleo de girassol, são necessárias 3,9 toneladas de sementes de girassol (PIMENTEL; PATZEK, 2005) e para cada tonelada de grão processada, são produzidos cerca de 350 e 250 kg de torta e casca de girassol, respectivamente (BORSUK, 2008). Por ser uma espécie ainda pouco conhecida e sem uma cadeia produtiva estabelecida no Brasil, as informações são escassas sobre as composições das tortas e farelos do girassol (OLIVEIRA, 2003).

A cultura de girassol vem ganhando importância devido à sua relevância para produção de óleo comestível, biodiesel e material ornamental (MACIEL et al., 2012). Segundo Backes et al. (2008), o crescimento se intensificou principalmente a partir de 2007 devido ao fomento do Programa Nacional de Incentivo para Biodiesel. Os mesmos autores citam que, em diversas regiões do Brasil, a demanda possibilitou forte expansão na área de cultivo, sendo a cultura apontada como a nova alternativa econômica em sistemas de rotação/sucessão de grãos.

Vale ressaltar que os setores de produção de biocombustíveis, como o de biodiesel, estão entre os segmentos da agroindústria que mais geram biomassa como rejeito (SILVA, et al., 2009), ou seja, na cadeia produtiva do biodiesel também são gerados materiais lignocelulósicos residuais que incluem desde a palha ao bagaço, provenientes das espécies oleaginosas como soja, canola, mamona e algodão (ALBUQUERQUE et al., 2009).

Estudos sobre o aproveitamento de subprodutos do processamento de girassol em bioprocessos são escassos. Há na literatura relatos recentes sobre a produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de cascas de girassol por *Pichia stipitis* (TELLI-OKUR; EKEN-SARAÇOGLU, 2006; JARGALSAIKHAN; SARAÇOGLU, 2009) e etanol por sacarificação enzimática de talos de girassol (SHARMA; KALRA; GREWAL, 2002) e cascas de girassol (SHARMA; KALRA; KROCHER, 2004). Segundo Telli-Okur; Eken-Saraçoglu (2008), o rendimento teórico de etanol, a partir da casca da semente de girassol, é $0,144 \text{ L.kg}^{-1}$ de bioetanol por matéria-prima seca. Ruiz et al. (2006) obtiveram uma concentração de 21g.L^{-1} de etanol pelo processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação quando empregaram talos de girassol e *Saccharomyces cerevisiae*.

Nesse sentido, o Brasil que já é destaque mundial como grande produtor de etanol de primeira geração também tem buscado desenvolver uma tecnologia eficiente e sustentável de conversão de biomassa em bioetanol. O País poderá incluir subprodutos oriundos da cadeia produtiva do girassol, visto que a mesma encontra-se em ampliação,

consequentemente, obterá, de forma totalmente renovável, um combustível com enormes vantagens em relação aos aspectos ambientais, econômicos e sociais.

3.2 Potencial dos resíduos lignocelulósicos

Os materiais orgânicos renováveis representam a maioria da biomassa total presente no mundo (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008). Esses são produzidos por diversos setores, incluindo indústrias, agricultura, silvicultura e a disposição inadequada, os quais resultam em vários problemas ambientais, questões de saúde e riscos para a segurança (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

A biomassa lignocelulósica proveniente dos materiais agroindustriais vegetais inclui resíduos florestais, agrícolas, industriais e culturas energéticas como madeira, bagaço de cana, sabugo de milho, palha de milho, palha de trigo, palha de arroz, capim, resíduos das fábricas de celulose como papel e ainda resíduos sólidos urbanos (KUMAR et al., 2010).

Os resíduos agrícolas são formados principalmente por compostos orgânicos denominados de lignocelulósicos (Figura 1), que estão em quantidades variadas entre as diferentes espécies (CASTRO; PEREIRA-JR, 2010). Em geral, há em torno de 20 a 60% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose e 15 a 30% de lignina (TAMANINI; HAULY, 2004).

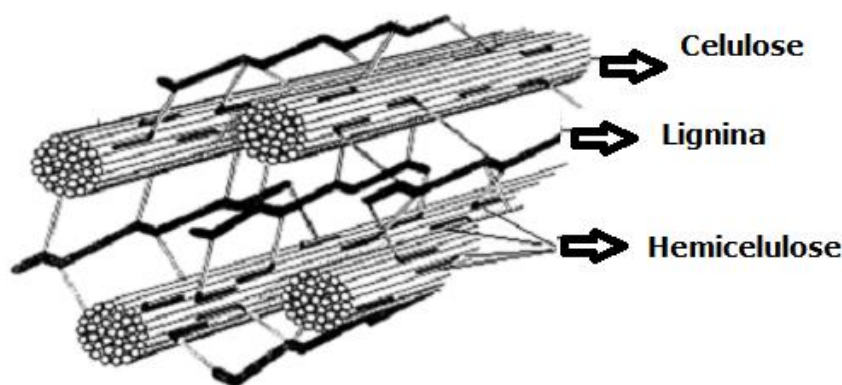


Figura 1 Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico (LEE, 1997).

A lignina é um polímero fenólico cuja função é conferir rigidez, impermeabilidade à água, resistência mecânica e microbiológica aos tecidos vegetais (TSAO, 1986). A lignina forma uma estrutura tridimensional, conforme demonstrada na Figura 2, que é particularmente de difícil degradação. É o composto mais recalcitrante da parede celular da planta, assim, quanto maior a proporção de lignina, maior a resistência à degradação química e enzimática (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

A celulose e a hemicelulose juntas atuam com a função principal de desempenhar papel estrutural da parede celular de sustentação e reserva (FERREIRA et al., 2009). A hemicelulose é formada por pentoses (xilose e arabinose) e por hexoses (glicose, manose e galactose) (SANTOS; SILVA, 2010). La também pode, em alguns tipos específicos de resíduos, apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos, grupos acetila e desoxihexoses (TAMANINI; HAULY 2004).

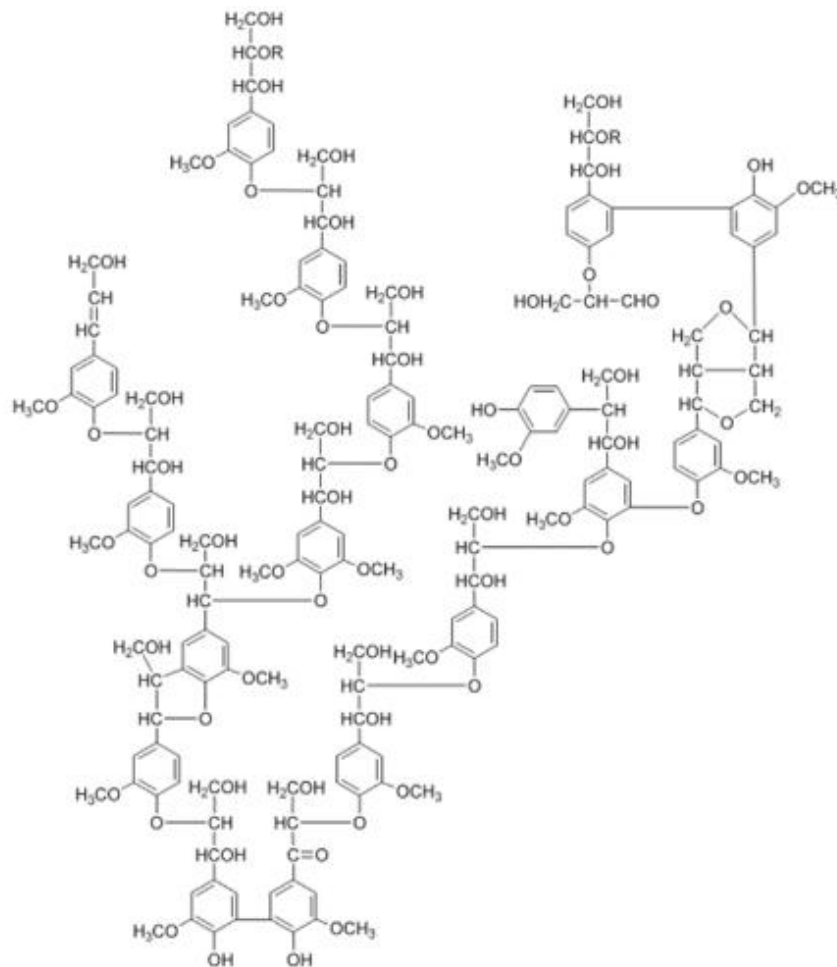


Figura 2 Modelo esquemático da lignina proposto por Adler (1977)

A celulose, conforme representada na Figura 3, é um polímero linear constituído por unidades de D-glicose, unidas por ligações denominadas de glicosídicas β -1 \rightarrow 4 (TSAO, 1986). As unidades repetitivas contêm seis grupos hidroxila que estabelecem as interações do tipo ligações de hidrogênio intra e intermolecular. Tais ligações de hidrogênio a tornam insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, devido à forte tendência da celulose formar cristais (SILVA et al., 2009).

Esses polissacarídeos, ou seja, açúcares de longas cadeias, podem ser transformados por reações químicas em açúcares redutores, que são substratos potenciais para biossíntese de produtos com valor agregado. Para isso, é importante usar todos os

açúcares disponíveis, ou seja, hexoses e pentoses, para obter um elevado rendimento de etanol (OLOFSSON; PALMQVIST; LIDÉN, 2010). Para a conversão da biomassa em açúcares monoméricos e a produção em bioetanol, o uso da biotecnologia representa a vantagem de reduzir os custos, uma vez que são utilizadas condições amenas de pressão e temperatura (SANTOS; SILVA, 2010).

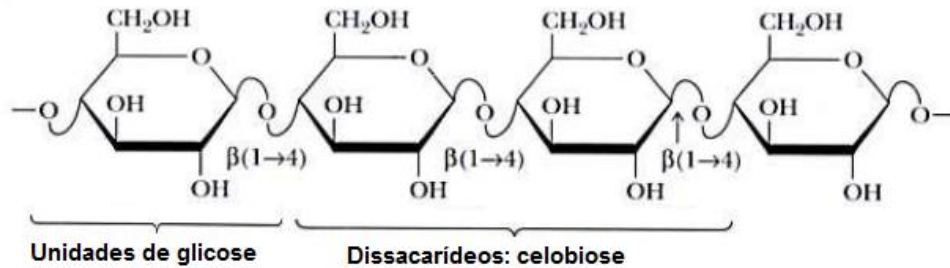


Figura 3 Representação da cadeia linear da celulose, com as unidades de glicose unidas por ligações β -1 \rightarrow 4 (CAMPBELL, 2000).

Na Figura 4 pode-se visualizar, de maneira geral, o esquema da produção de etanol a partir das frações celulósica e hemicelulósica, presentes nos resíduos lignocelulósicos que são convertidos em seus respectivos açúcares. Por conseguinte, estão demonstradas as diferentes etapas de pré-tratamento, hidrólise e fermentação empregadas nos procedimentos de produção de bioetanol.

O interesse em pesquisas que visam ao aproveitamento de materiais lignocelulósicos vem sendo demonstrado em diversos trabalhos que têm proposto a utilização de hidrolisados a partir das biomassas agroindustriais, como é o caso da produção biotecnológica de xilitol (SENE et al., 2001; ROBERTO et al., 1996), produção de etanol (CHANDRAKANT; BISARIA, 1998) e enzimas (PANDEY et al., 2000).

Segundo Rodrigues; Camargo (2008), hoje, o uso da biomassa é considerado a fonte de energia do futuro. Sendo assim, a utilização da biomassa do ponto de vista energético, através da hidrólise em açúcar fermentável, aumentará a produção de etanol combustível sem aumentar a área plantada. Nesse contexto, o desenvolvimento do etanol de segunda geração, produzido a partir da celulose presente nos resíduos agrícolas e em outras matérias-primas vegetais, demonstra a vantagem de reduzir a competição entre biocombustíveis e alimentos (SACHS, 2007).

3.3 Etapas de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos apresentam teor de celulose que varia de 20 a 60% e de hemicelulose de 20 a 40% dependentes do tipo de biomassa (STICKLEN, 2008). Tais

frações podem ser utilizadas para a produção de etanol, conforme mostra o esquema da Figura 4.

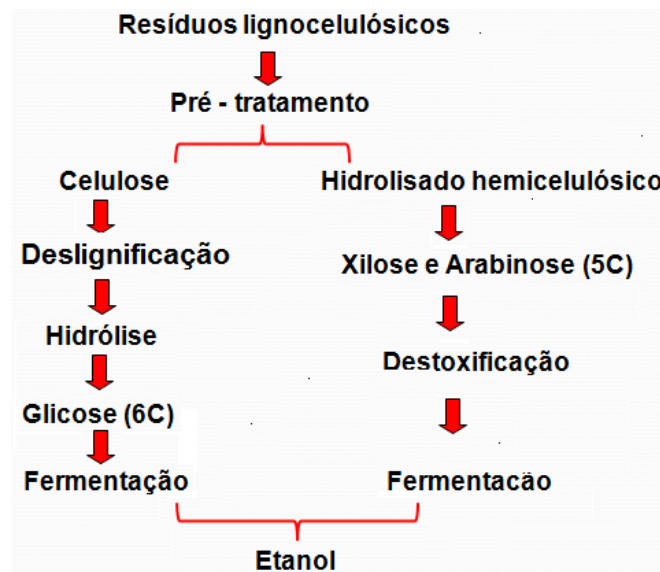


Figura 4 Esquema da produção de etanol a partir das frações celulósica e hemicelulósica de biomassa vegetal

3.3.1 Etapas de produção de etanol a partir da fração celulósica

O bioetanol de segunda geração, embora ainda não tenha sido produzido em escala comercial, representa uma grande parcela das pesquisas atuais e boas perspectivas futuras. Para isso, é importante o estabelecimento de metodologias que resultem na valorização de materiais lignocelulósicos. Em particular, o desenvolvimento de processos a partir da biomassa envolve condições adequadas de forma integrada, de diversas etapas: pré-tratamento, hidrólise e fermentação dos hidrolisados. Para a avaliação da eficiência de diferentes processos alternativos, é fundamental uma caracterização precisa da composição química da biomassa durante a sua conversão nas diferentes etapas (GOUVEIA *et. al.*, 2009).

Para utilização mais eficiente dos polissacarídeos da celulose, haja vista sua estrutura ser rígida e complexa, é necessário um pré-tratamento a fim de remover eficientemente a porção hemicelulósica e a lignina como estratégia para facilitar o rompimento das fibras. Assim, aumenta-se a área superficial, expõe-se e disponibiliza-se a molécula de celulose, conforme a Figura 5 (SANTOS; GOUVEIA, 2009; MOSIER *et al.*, 2005).

Os pré-tratamentos, para serem considerados interessantes para a produção de bioetanol, devem melhorar o rendimento da sacarificação da celulose; não provocam a perda ou degradação dos carboidratos; não promovem a formação de subprodutos inibidores dos processos fermentativos e apresentam um custo-benefício compensatório

(KUMAR et al., 2009). Se o pré-tratamento for muito severo, os açúcares liberados podem ser degradados a compostos que inibem a atividade das enzimas e a fermentação, além de diminuir o rendimento geral das enzimas. Por outro lado, se as condições de pré-tratamento forem muito brandas, haverá uma baixa acessibilidade da enzima e os mesmos inconvenientes (SENDELIUS, 2005).

Os processos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos podem ser químicos, físicos ou biológicos ou uma combinação de todos esses. Isso dependerá do grau de separação desejado e do fim proposto. Cada um desses processos conduz a um conjunto de produtos e utilizam diferentes configurações de equipamentos, com operação particular (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

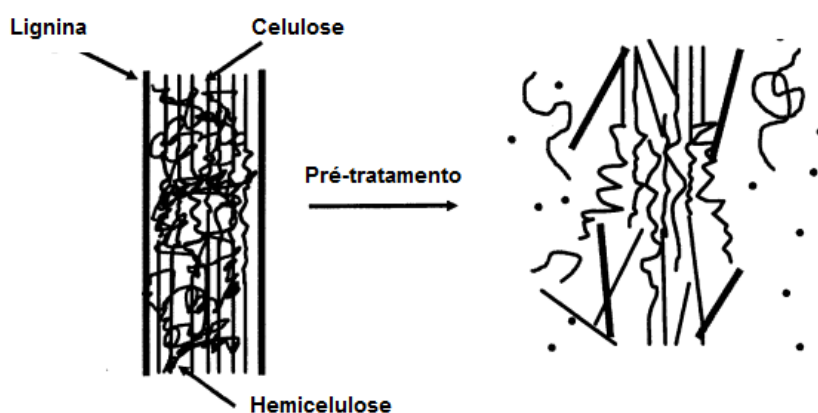


Figura 5 Representação do efeito do pré-tratamento na fibra lignocelulósica

Fonte: MOSIER et al. (2005)

Os processos químicos são os mais investigados dentre os métodos, devido à eficácia e ao baixo custo. Quando tais processos são empregados, usam-se ácido, bases, amônia, solventes orgânicos (metanol, acetona, etanol, etilenoglicol, álcool tetrahidrofurfural). Os objetivos principais desses são melhorar a biodegradabilidade de celulose pela remoção de lignina e/ou hemicelulose e diminuir o grau de polimerização e cristalinidade do componente de celulose (ZHENG; PAN; ZHANG, 2010).

Em geral, a hidrólise ácida é realizada com ácido sulfúrico, assim, ocorre uma despolimerização, formando os chamados oligômeros e seus açúcares constituintes, isto é, suas unidades repetitivas. O modo de ação de um ácido diluído é para solubilizar hemicelulose, mas, a lignina e a celulose permanecem intactas (ZHENG PAN; ZHANG, 2010). A hidrólise ácida pode ser concentrada ou diluída. Na hidrólise ácida diluída ainda pode ser usada hidrólise enzimática como pré-tratamento anterior ou como método para hidrolisar a hemicelulose em açúcares (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

O pré-tratamento alcalino, por sua vez, é um processo que tem por objetivo principal a deslignificação, porém, uma quantidade significativa de hemicelulose é solubilizada. O

mecanismo de ação é a saponificação das ligações ésteres intermoleculares da hemicelulose e lignina (ZHENG; PAN; ZHANG, 2010).

De acordo com Kumar et al. (2009), o pré-tratamento com solução diluída de NaOH gerou vários efeitos sobre o material lignocelulósico, no qual podem ser citados o aumento da superfície interna (inchaço), a diminuição no grau de cristalinidade e a polimerização, além da separação estrutural das ligações entre a lignina e os carboidratos, fatores que melhoram o desempenho da hidrólise.

A hidrólise enzimática da celulose é o procedimento mais comum para a redução dos polissacarídeos em monossacarídeos como a glicose. Nesse procedimento, em geral, os materiais são conduzidos à redução dos polímeros através de enzimas celulases que são uma mistura de diversas enzimas. Os três maiores grupos de celulases envolvidos no processo de hidrólise são: endoglucanases; exoglucanases e β -glucosidases (SUN; CHENG, 2002).

As endoglucanases reduzem significativamente o grau de polimerização do substrato por atacar aleatoriamente as moléculas internas, principalmente nas regiões amorfas da celulose, clivando a ligação beta, dentro de celulose. As exoglucanases, por outro lado, de forma incremental a partir das extremidades da cadeia de celulose pela ligação às extremidades, liberam principalmente unidades de celobiose. Finalmente, as β -glucosidases dividem o dissacarídeo celobiose em duas unidades de glicose (LIMA; RODRIGUES, 2005).

A hidrólise enzimática é conduzida em condições amenas de pH (4,8) e de temperatura (45-50 °C) e exibe elevada especificidade, pois elimina a chance de ocorrência de substâncias tóxicas (furfurais e derivados de lignina) para as células microbianas, que serão utilizadas para fermentação do meio hidrolisado. A única problemática relacionada diz respeito ao elevado custo de produção dos biocatalizadores. Por outro lado, são detectados pontos de economia no processo, tanto do ponto de vista energético como metalúrgico, visto que os equipamentos podem ser confeccionados com materiais menos nobres (DUFF; MURRAY, 1996).

A carga enzimática utilizada é dependente das variáveis como as concentrações máximas de produto, obtidas durante as hidrólises. Ela é determinada pelas diferenças metodológicas nos pré-tratamentos, pelas diferentes técnicas analíticas utilizadas na determinação da concentração dos açúcares liberados e pela concentração de substrato no sistema, fator diretamente relacionado à taxa de diluição dos hidrolisados (CASTRO; PEREIRA-JR, 2010).

O procedimento seguinte consiste na fermentação alcoólica em que ocorre a conversão dos açúcares em etanol. Neste ponto, é primordial a escolha adequada dos microrganismos utilizados no processo fermentativo para resultar na máxima bioconversão dos materiais lignocelulósicos em substâncias com maior valor agregado (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009).

A fermentação pode ser conduzida de forma sequencial ao processo de hidrólise enzimática denominada de “Separate Hydrolysis and Fermentation” (SHF) ou ainda pode ocorrer de maneira simultânea, ou seja, sacarificação simultânea à fermentação (SSF), conforme esquematizado na Figura 6. O problema na operação do primeiro é que a glicose e a celobiose permanecem no mesmo meio que a celulose e as celulases, e esses mono e dissacarídeos inibem a ação das enzimas (OGEDA; PETRI, 2010). A vantagem da utilização de hidrólise e fermentação de forma separada é que ambos processos podem ser otimizados individualmente (por exemplo, temperatura ótima de 45-50 °C durante a hidrólise e 30 °C para a fermentação), visto que ocorrem em reatores diferentes (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009).

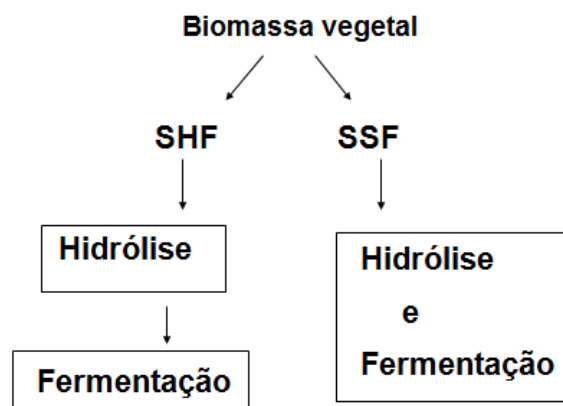


Figura 6 Representação do esquema da sacarificação em separado e simultânea à fermentação

Uma opção atrativa para produção de etanol lignocelulósico é realizar a hidrólise enzimática juntamente com a fermentação, ao invés de forma sequencial, já que resulta em um processo mais rentável (KADAR; SZENGYEL; RECZEY, 2004).

Os principais benefícios de se realizar a hidrólise enzimática ao mesmo tempo em que ocorre a fermentação é a contribuição com menor custo de investimento, visto que nele são agrupadas duas etapas em um único reator. Também nessa forma de condução, as enzimas são menos passíveis de inibição pelos produtos da hidrólise, pois a glicose liberada é concomitantemente fermentada. As principais desvantagens, por outro lado, são a necessidade de encontrar condições favoráveis (por exemplo, temperatura e pH) tanto para a hidrólise enzimática como para fermentação e a dificuldade de reciclar os organismos e as enzimas (OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008).

No entanto, leveduras termotolerantes têm sido investigadas para que sejam capazes de produzir etanol em temperaturas elevadas. Isolados de *Kluyveromyces*

marxianus estão sendo promovidos como alternativa viável para substituir *Saccharomyces cerevisiae* (NONKLANG et al., 2008).

Ballesteros et al., (2004), ao realizarem a sacarificação simultânea à fermentação com biomassa tratada a 42 °C, 10% (p.v⁻¹) da concentração de substrato e 15 FPU.g⁻¹ de celulase comercial e empregarem a levedura *K. marxianus* estirpe CECT 10875, relataram rendimentos promissores de 50-72% em 72-82 horas, com teor de 16-19 g.L⁻¹ de etanol dependendo da biomassa lignocelulósica testada.

3.3.2 Etapas de produção de etanol a partir da fração hemicelulósica

De forma abrangente, as etapas de produção etanol de segunda geração, a partir da porção hemicelulósica, consistem na conversão dos polissacarídeos em seus monômeros, através da adição de água à molécula seguida pela fermentação (OGEDA; PETRI, 2010).

Para que o processo de hidrólise ocorra, é necessária a presença de um catalisador (SOARES; ROSSEL, 2007). Geralmente, a hidrólise é realizada com ácido sulfúrico, devido ao seu menor preço e aos poucos problemas como corrosão quando comparada, por exemplo, ao ácido clorídrico (OGEDA; PETRI, 2010). Durante a hidrólise ácida ocorre a despolimerização, em que são formados os oligômeros e seus açúcares constituintes, isto é, suas unidades repetitivas. No caso da hemicelulose, as maiores frações são de xilose, ácido acético, provenientes dos grupos acetil e furfural. Para a celulose, são formados a glicose e o hidroximetilfurfural (HMF) (GOUVEIA et al., 2009).

Esse mesmo processo gera frações que conferem limitações suficientes para retardar, ou mesmo impedir completamente, a atuação microbiana sobre o hidrolisado (CASTRO; PEREIRA-JR, 2010). Ou seja, durante o processo de hidrólise, além da liberação dos açúcares, é comum ocorrer a formação de compostos tóxicos para o microrganismo, provenientes da degradação de hexoses e pentoses, como 5-hidroximetilfurfural e furfural, respectivamente ou da lignina, como compostos aromáticos, fenólicos e aldeídicos.

Devido à presença desses compostos tóxicos aos microrganismos, quando o hidrolisado é utilizado diretamente em processos de bioconversão, ocorrem a diminuição da eficiência do processo fermentativo, a redução do rendimento e a produtividade (MUSSATO; ROBERTO, 2004). Vários tipos de tratamentos podem ser aplicados com o objetivo de diminuir e facilitar uma posterior bioconversão bem como reduz os efeitos inibitórios (REYES; PERALTA-ZAMORA; DURAN, 1998), procedimentos que incluem submeter o hidrolisado a alterações do pH do meio pela adição de ácidos/bases e a utilização de carvão ativo (TAMANINI; HALLY, 2004). Vale ressaltar que a resina de troca iônica tem demonstrado ser uma técnica eficiente para remoção dos inibidores presentes no hidrolisado, porém o alto custo desta técnica inviabiliza seu uso industrial (FONSECA, 2009).

A viabilidade econômica da produção do bioetanol a partir de matéria-prima lignocelulósica é dependente do aproveitamento por microrganismos que sejam capazes de fermentar os açúcares presentes nas matérias-primas, incluindo as pentoses, como a arabinose e principalmente xilose, provenientes da fração hemicelulósica das matérias-primas (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008). Porém, na maioria desses casos, os microrganismos disponíveis para comercialização não são capazes de metabolizar as pentoses de forma eficiente (BETTIGA; BENGTSSON; HAHN-HÁ, 2009).

O mesmo pode ser verificado pelo *S. cerevisiae*, que apesar de ser um dos mais eficientes organismos produtores de etanol, só consegue naturalmente converter e aproveitar as hexoses, mas, não é capaz de fermentar a xilose (OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008). No entanto, algumas leveduras demonstram grande potencialidade para fermentar as pentoses presentes na biomassa hemicelulósica e incluem linhagens das leveduras *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus* (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008).

O esquema da utilização da xilose por leveduras está demonstrado na Figura 7, que começa logo após a absorção do açúcar. Mas, no interior da célula, a xilose é reduzida a xilitol pela reação catalisada pela enzima xilose redutase (XR), dependente da coenzima NADPH/NADH. Posteriormente, o xilitol é oxidado a xilulose pela ação da enzima xilitol desidrogenase (XDH) que requer NADP⁺/NAD⁺. Em seguida, a xilulose é fosforilada a xilulose-5-fosfato pela enzima xilulose quinase com consumo de ATP, a qual é então convertida em piruvato por meio da conexão da via das fosfopentoses com a via Embden-Meyerhof-Parnas (JEFFRIES; VLEET 2009; CHANDEL et al., 2011).

As leveduras como *P. stipitis*, em condições anaeróbias ou limitadas de oxigênio, apresentam as atividades de XR ligadas ao NADH e NADPH. Neste caso, ocorre a regeneração do NAD⁺ consumido na segunda etapa do metabolismo de D-xilose, no qual o produto principal é o etanol e não há acumulação de xilitol devido ao equilíbrio redox entre os cofatores XR e XDH. Em contrapartida, as leveduras que consomem D-xilose, apenas por atividade de XR dependente de NADPH (com completa ausência de NADH ligada ao XR), na primeira etapa do metabolismo de D-xilose, acumulam xilitol. Mas, na segunda etapa, o xilitol é oxidado por XDH, geralmente na presença de NAD⁺.

Além dos microrganismos utilizados no processo fermentativo, vários outros fatores que interferem nos rendimentos de etanol são conhecidos, tais como pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio, composição do meio de cultura entre outros (SILVA et al., 2011).

Entre as leveduras, a *P. stipitis* tem demonstrado ser o melhor microrganismo natural que fermenta xilose e parece industrialmente interessante por metabolizar a xilose de maneira rápida com rendimentos elevados na produção de etanol (NIGAM, 2001). Ela é capaz de produzir etanol a partir de glicose, galactose, manose, xilose e celobiose

(AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008). Além disso, uma menor produção de xilitol é verificada a partir da fermentação de açúcares (TOIVOLA et al., 1984). Outra característica importante é a resistência à contaminação devido às suas paredes celulares grossas, o que a torna um organismo viável para “scale-up” (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008).

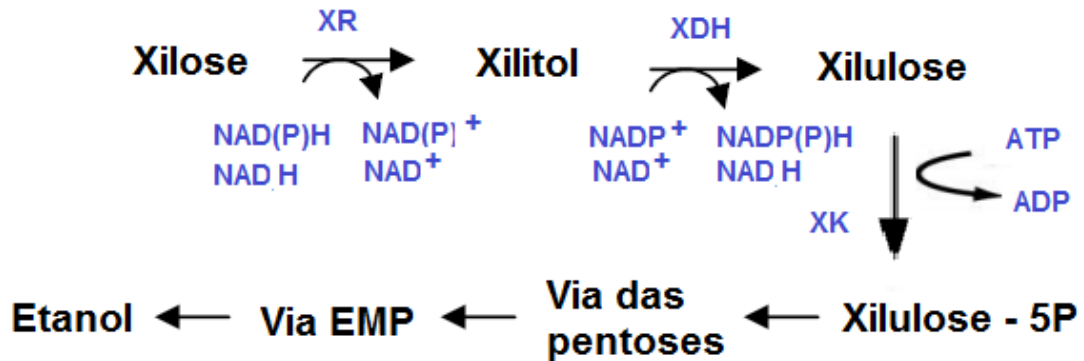


Figura 7 Esquema da utilização da xilose por leveduras

A temperatura ideal para fermentação de *P. stipitis* varia entre 25 e 33 °C e o pH ideal é de 4,5 a 5,5 (DU-PREEZ, BOSCH; PRIOR, et al., 1986). Já as altas concentrações de açúcar aumentam o estresse osmótico, portanto, reduzem o crescimento e a taxa de fermentação. Além disso, as concentrações elevadas de etanol alteram a organização da membrana celular, na qual dissipam a força motriz protônica através da membrana plasmática o que acidifica o citoplasma e leva à morte celular (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Biomassa proveniente do processamento das sementes de girassol

As biomassas utilizadas nos experimentos foram a torta e o farelo de girassol mostrados na figura 8, gentilmente cedidas pela empresas Biolix de Rolândia-PR e Caramuru Alimentos de Itumbiara-GO. A primeira foi processada via prensagem a frio direto em extrusora e a segunda com hexano.



Figura 8 Aspecto da torta e farelo de girassol após trituação e secagem

Após a chegada dos resíduos ao Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações (LAETEF) da UNIOESTE, *campus* de Cascavel, onde foram realizados os ensaios, os mesmos foram armazenados em sacos plásticos com capacidade de 50 L e mantidos em refrigerador à temperatura aproximada de 4 °C até o momento dos experimentos.

Antes da utilização, os resíduos foram triturados a uma granulometria 50 mesh em moinho de facas, pesados, secos em estufa à temperatura de 50 °C durante 12 horas e mantidos em dessecador.

4.2 Análise da composição química da matéria prima

Inicialmente, foi feita uma caracterização química de ambos os materiais para determinação dos teores de celulose, hemicelulose e lignina, através da hidrólise ácida quantitativa dos polissacarídeos, conforme metodologia validada por Gouveia et al., (2009). Para isso, foram adicionados 2 g do material em base seca e 10 mL de ácido sulfúrico (72% m.m⁻¹) em um béquer de 100 mL, seguido da incubação da mistura em banho termostático a 45 °C, sob agitação contínua por 7 minutos. Ao concluir esse tempo, 50 mL de água destilada foram adicionados para que a reação fosse interrompida. Em seguida, fez-se a

transferência quantitativa para frasco Erlenmeyer de 500 mL e foram adicionados 275 mL de água destilada. Para uma hidrólise completa dos oligômeros, o frasco Erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e autoclavado a uma pressão de 1,05 bar (121 °C) por 30 minutos.

Após a decompressão e retirada do material da autoclave, o frasco foi resfriado à temperatura ambiente e a mistura reacional foi filtrada e transferida para um balão volumétrico de 500 mL, o qual foi completado com a água de lavagem do material retido no filtro. Os hidrolisados foram armazenados para posterior análise de açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose), ácidos orgânicos, compostos tóxicos e lignina solúvel.

4.2.1 Determinação do teor de lignina insolúvel

O resíduo insolúvel que permaneceu no papel filtro quantitativo (Qualy – poro 14 µm), proveniente da fase de hidrólise ácida da caracterização química, passou por lavagem com aproximadamente 1,5 L de água destilada para remoção do ácido residual (até pH próximo de 7) e foi submetido à secagem em estufa a 105 °C até massa constante. A quantidade de lignina em porcentagem foi calculada em relação à massa seca, após ser descontada a massa de cinzas da lignina, de acordo com a Equação 1:

$$\%L_{ki} = \left(\frac{M_k - M_c}{M_a} \right) * 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Em que:

L_{ki} - lignina Klason insolúvel;

M_k - massa de lignina insolúvel seca;

M_c - massa de cinzas;

M_a - massa da amostra seca.

4.2.2 Determinação do teor de cinzas da lignina

Para a determinação de cinzas presentes na lignina, os resíduos da etapa de determinação da lignina insolúvel foram dispostos em cadinhos de porcelana, previamente padronizados em mufla a 550 °C, e submetidos à calcinação a 600 °C por 3 horas. Posteriormente, os cadinhos foram resfriados à temperatura ambiente em dessecador e pesados em balança analítica (Shimadzu – AY220) para determinação do teor de cinzas. A massa obtida foi utilizada para descontar o teor de lignina, descrito no item 4.2.1, obtendo-

se então o valor real de lignina insolúvel. A porcentagem de cinzas foi calculada segundo a Equação 2:

$$\% \text{cinzas} = \left(\frac{M_c}{M_a} \right) * 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Em que:

% cinzas - percentual em massa de cinzas;

M_c - massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio);

M_a - massa da amostra seca.

4.2.3 Determinação de lignina solúvel

Para a quantificação da lignina solúvel, alíquotas de 5 mL dos hidrolisados foram transferidas para um balão volumétrico de 100 mL, juntamente com 50 mL de água destilada e 2 mL de NaOH 6,5 N. Foram realizadas a agitação e a complementação do volume do balão com água destilada. A absorbância da solução foi medida a 280 nm em espectrofotômetro (UV-VIS FEMTO 700 Plus). A Equação 3 foi utilizada para determinar a concentração de lignina solúvel:

$$C_{lig} = 4,187 * 10^{-2} (A_t - A_{pd}) - 3,279 * 10^{-4} \quad \text{Equação (3)}$$

Em que:

C_{lig} - concentração de lignina solúvel, em g. L⁻¹;

A_T - absorbância (280 nm) da solução de lignina com os produtos de degradação;

$A_{pd} = c_1 \epsilon_1 + c_2 \epsilon_2$ - absorbância a 280 nm dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações c_1 e c_2 foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e ϵ_1 e ϵ_2 são as absortividades, as quais valem respectivamente, 146,85 e 114,00 L.g⁻¹ cm⁻¹.

Para determinação das concentrações de açúcares nos hidrolisados, amostras foram purificadas em cartuchos *Sep Pak C18* (MILLIPORE) e analisadas em cromatógrafo líquido, conforme descrito no item 4.9.

Os teores de celulose e hemicelulose foram determinados conforme as Equações 4 e 5, respectivamente:

$$C_{\text{cel}} = \frac{C_{\text{gli}}}{1,111} \quad \text{Equação (4)}$$

Em que:

C_{cel} - teor de celulose;

C_{gli} - concentração de glicose presente no hidrolisado;

$$C_{\text{hem}} = \left(\frac{C_{\text{xil}} + C_{\text{ara}}}{1,136} \right) + \left(\frac{C_{\text{Ac}}}{1,389} \right) \quad \text{Equação (5)}$$

Onde:

C_{hem} - teor de hemicelulose;

C_{xil} - concentração de xilose;

C_{ara} - concentração de arabinose;

C_{Ac} - concentração de Ácido Acético.

4.2.4 Determinação do teor de cinzas totais

Para a quantificação das cinzas totais, 2 g de amostra seca foram colocados em cadinhos de porcelana, previamente padronizados em mufla a 550 °C e em seguida submetidos à calcinação a 600 °C por três horas. Após esse tempo, os cadinhos foram retirados, resfriados à temperatura ambiente em dessecador e posteriormente pesados para determinação da massa de cinzas.

4.2.5 Determinação de lipídios

Para a quantificação de lipídios totais, a torta e farelo de girassol foram acondicionados em envelopes de papel de filtro e extraídos em aparelho de determinação de gordura (TE - 044) com éter de petróleo, seguido da evaporação do solvente em estufa a 105 °C até obtenção de massa constante.

4.3 Avaliação das condições de hidrólise da fração hemicelulósica

Realizou-se um experimento inteiramente casualizado para comparação das melhores condições de hidrólise na obtenção de licores ricos em xilose da fração hemicelulósica da torta e farelo de girassol. Esta metodologia consistiu de hidrólise direta, conduzida em autoclave à temperatura de 121 °C, com variações no tempo (20, 40, 60 min) e na concentração do ácido sulfúrico (2, 4 e 6%). Para cada ensaio, foram colocados 10 g da biomassa vegetal em base seca, em frascos Erlenmeyer de 500 mL, nos quais, posteriormente, foram adicionados 100 mg de ácido sulfúrico (98% de pureza, Vetec) para

cada grama do resíduo (matéria seca) a uma razão entre biomassa e volume de solução ácida de 1:10. Em seguida, os hidrolisados foram avaliados quanto ao pH e à concentração de fenóis totais e armazenados a -20 °C até o momento da determinação dos açúcares, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural.

A massa sólida residual de todos os experimentos foi lavada com água destilada até pH próximo a neutro e foi destinada para as análises de celulose, hemicelulose e lignina, conforme metodologia descrita no item 4.2.

4.4 Tratamento do hidrolisado hemicelulósico do farelo

Após a análise por cromatografia líquida de alta eficiência dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos sob diferentes condições de hidrólise, o farelo foi o resíduo selecionado. Esse foi submetido à condição escolhida com 6% de ácido sulfúrico e 20 minutos (condição que proporcionou elevada concentração de xilose e baixo teor de inibidores) a fim de se obter uma maior quantidade de hidrolisado a ser utilizado como meio para a produção de etanol a partir da xilose.

Tendo em vista a presença nos hidrolisados hemicelulósicos de compostos inibidores à atividade microbiana, esses foram submetidos ao tratamento químico de destoxificação conforme a metodologia descrita por Mussatto e Roberto (2004) com modificações. Este procedimento consistiu no acréscimo do pH inicial do hidrolisado para pH 7,0 pela adição de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, seguida da adição de ácido fosfórico concentrado até a redução do pH para 5,5. Após, o hidrolisado foi submetido à adsorção em carvão ativado em pó na proporção de 1 g de carvão para 40 g de hidrolisado, com agitação em incubadora de movimento giratório 200 rpm, 60 °C por 1 hora. O hidrolisado foi centrifugado a 2000 rpm por 20 minutos e filtrado a vácuo, em filtro de porcelana com papel filtro qualitativo para a remoção do precipitado formado.

Logo após o tratamento, o hidrolisado foi caracterizado quanto ao pH, às concentrações de açúcares (glicose, xilose e arabinose) e aos compostos tóxicos como ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural e fenóis totais.

4.5 Determinação da recuperação de pentoses do hidrolisado hemicelulósico do farelo

A recuperação de pentoses foi calculada a partir da percentagem de separação de pentosanas conforme as Equações 6 e 7 após o processo de hidrólise, segundo Mussatto (2002):

$$MSP = \left(\frac{QPA * HPA}{FC * 100 * VSA} \right) \quad \text{Equação (6)}$$

Em que:

MSP - Máxima separação de pentoses (g.L^{-1});

QPA - Quantidade de torta ou farelo (g);

HPA - Porcentagem de hemicelulose na torta ou no farelo (%);

FC - Fator de conversão de xilana em xilose (0,88);

VSA - Volume da solução ácida (L).

$$SPO = \left(\frac{Xil * Arab}{MSP} \right) * 100 \quad \text{Equação (7)}$$

Em que:

SPO - Separação de pentoses obtidas (%);

Xil - Concentração de xilose (g.L^{-1});

Arab - Concentração de arabinose (g.L^{-1}).

4.6 Deslignificação do resíduo sólido do farelo de girassol

A massa sólida proveniente do farelo de girassol que foi submetido à condição de hidrólise com 6% de ácido sulfúrico e 20 minutos, após a caracterização química do teor de celulose, hemicelulose e lignina, foi lavada vigorosamente com água destilada e submetida ao processo de deslignificação, conforme metodologia de Silva et al., (2011). Essa consistiu do pré-tratamento alcalino com solução de 1% de hidróxido de sódio (NaOH), adicionada na biomassa na proporção de 1:20 (m.v^{-1}), seguida de tratamento térmico a 121 °C em autoclave por 20 minutos. O material sólido foi lavado com água quente até pH próximo ao neutro.

O resíduo seguiu das análises quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina conforme descrito no item 4.2 e foi armazenado a -20 °C, até o momento de sua utilização nos ensaios de SSF.

4.7 Fermentações

4.7.1. Microrganismos

Os bioensaios para a produção de etanol a partir de pentose e hexose, provenientes da hidrólise do farelo de girassol, foram conduzidos com as leveduras *Pichia stipitis* ATCC 58376 (figura 9a e 9b) e *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 (termotolerante) (Figura 10) respectivamente, adquiridas da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello, Campinas - SP. As culturas foram mantidas em tubo de ensaio contendo “Malt Extract Agar Base” – HiMedia (extrato de malte 30 g.L⁻¹, peptona micológica 5 g.L⁻¹ e ágar 15 g.L⁻¹), a 4 °C.

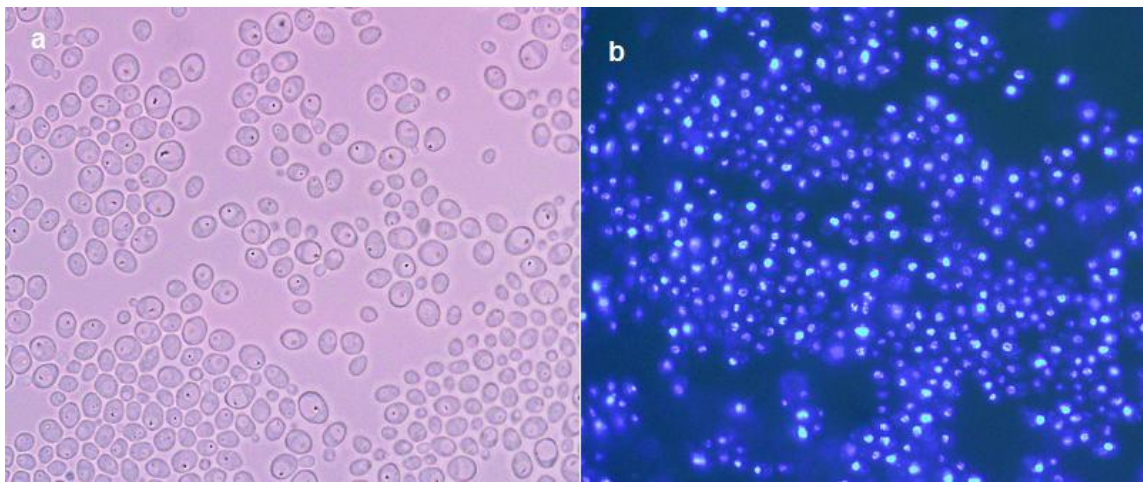


Figura 9 Fotografia de células de *P. stipitis* sem coloração (a) fotografia de células de *P. stipitis* coradas com corante fluorescente DAPI (b) ambas com aumento de 800x.

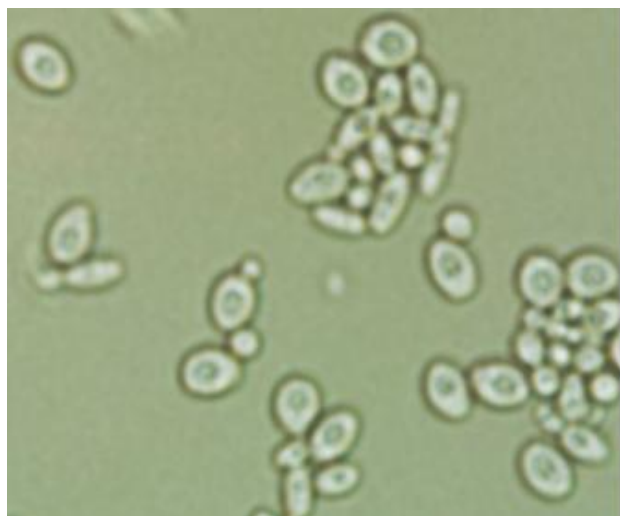


Figura 10 Fotografia de células de *K. marxianus* sem coloração (aumento de 1000x).

Para o preparo do inóculos da *P. stipitis* e *K. marxianus*, essas leveduras foram cultivadas em Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio Yeast Malt Peptone Medium (YMP), formulado com 10 g.L⁻¹ glicose, 3 g.L⁻¹ extrato de malte, 3 g.L⁻¹ extrato de levedura, 5 g.L⁻¹ de peptona, com agitação em incubadora rotatória (Marconi MA-240) a 200 rpm, temperatura 30 °C, por 16 horas.

As células foram centrifugadas a 2000 rpm por 20 min, lavadas com água destilada estéril e após nova centrifugação, resuspensas em água destilada estéril, para então, serem utilizadas como inóculo a uma concentração celular inicial de 1 g.L⁻¹.

Para ambas as leveduras, após o cultivo do inóculo, foi realizada a análise da morfologia, para isso, uma alíquota foi adicionada à lâmina de vidro a qual foi vedada com lamínula de vidro e visualizada em microscopia de luz. Para a análise fluorescente, foi adicionada uma gota de Vectashield seguida da visualização em microscópio epifluorescente.

4.7.2 Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol por *P. stipitis*

O hidrolisado tratado foi suplementado com os mesmos nutrientes utilizados no preparo do inóculo, exceto a glicose, e autoclavado a 115 °C por 15 minutos. Em seguida, 50 mL foram adicionados nos frascos Erlenmeyer de 125 mL previamente esterilizados a 121 °C durante 20 minutos. Após a adição do inóculo, os frascos foram incubados em incubadora rotatória (MARCONI MA-240) a 30 °C, cuja agitação variou entre 100; 150 e 150 rpm, por um período de 72 horas.

Foram retiradas amostras em intervalos de tempo de 24 horas e após a medição da concentração celular, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm para separação das células e o sobrenadante foi armazenado a -20 °C até o momento das análises de consumo de açúcares, inibidores e produção de etanol.

4.7.3. Sacarificação simultânea à fermentação da biomassa proveniente do farelo de girassol com *K. marxianus*

Após a remoção da fração hemicelulósica por hidrólise ácida diluída do farelo de girassol com 6% de ácido sulfúrico, por 20 minutos e da deslignificação com NaOH, a fração celulósica restante foi seca em estufa a 50 °C por 2 horas e seguiu ao processo de sacarificação simultânea para a fermentação (SSF), realizada conforme metodologia utilizada por Ballesteros et al., (2004). A biomassa celulósica, após o pré-tratamento, foi transferida para frascos de Erlenmeyers de 125 mL numa proporção de 8% (m.v⁻¹), aos quais foram adicionados 50 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 5,5 e suplementado com 3 g.L⁻¹ extrato de malte, 3 g.L⁻¹ extrato de levedura, 5 g.L⁻¹ de peptona.

Visando favorecer os resultados, foram realizados experimentos com variação na dosagem enzimática de celulase e de β -glicosidase. As cargas enzimáticas empregadas foram de 10; 15 e 20 FPU.g⁻¹ de Cellulase complex NS22086 e 1/3; 1,5/3 e 2/3 de β -glicosidase NS22118 em relação à celulase, ambas do “Novozymes Cellulosic Ethanol Enzyme” Kit, cedido pela Novozymes. A matriz do planejamento experimental está apresentada na Tabela 1.

Em todos os experimentos, após a adição do inóculo, os frascos foram agitados a 150 rpm em incubadora de movimento rotatório a 38 °C por 72 horas. Para a construção dos perfis da hidrólise enzimática, foram coletadas amostras em intervalos de tempo de 12, 24, 48 e 72 horas, as quais foram posteriormente quantificadas quanto à concentração de açúcares e etanol produzido.

Tabela 1 Matriz do planejamento dos experimentos com 10; 15 e 20 FPU.g⁻¹ da Celulase NS 22086 e 1/3; 1,5/3 e 2/3 de β - glicosidase NS22118 para a sacarificação simultânea à fermentação do resíduo do farelo de girassol empregando *K.marxianus* ATCC 36907.

Experimentos	Celulase NS22086 (FPU. g ⁻¹)	β -glicosidase NS22118 (CBU. g ⁻¹)
1	10	6,6
2	10	5
3	10	3,3
4	15	10
5	15	7,5
6	15	5
7	20	13,3
8	20	10
9	20	6,6

4.8 Determinação da concentração de fenóis

A concentração de fenóis totais nos hidrolisados foi determinada conforme o método de Folin Ciocalteu, descrito por Singleton; Orthofer; Lamuelaraventos, (1999). Neste processo, foram adicionados 0,2 mL de reagente Folin Ciocalteu a 3 mL de amostra do hidrolisado. Passados 5 minutos, foram adicionados 0,8 mL de solução de carbonato de sódio (150 g. L⁻¹), seguidos de agitação dos tubos em vórtex. As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e posteriormente determinadas as absorbâncias em espectrofotômetro (UV-VIS FEMTO 700 Plus) a 760 nm. Para a obtenção das concentrações, utilizou-se uma curva padrão de vanilina (Synth – 98% de pureza).

4.9 Determinação da concentração de açúcares, ácido acético, xilitol, glicerol e etanol

Para quantificação dos açúcares, ácido acético e etanol, amostras foram purificadas em cartucho “Sep Pak” C18 e analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu, modelo 20A) com detector de índice de refração, empregando coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (8%) 150 x 7.8 mm, fase móvel H₂SO₄ 0,005 mol.L⁻¹, fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura do forno de 65 °C. O eluente foi filtrado a vácuo por membrana GVWP 0,45 µm (MILLIPORE).

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, xilitol e celobiose bem como ácido acético, glicerol e etanol foram determinadas a partir de curvas padrão obtidas com padrões de alta pureza (98-99%, SIGMA e VETEC).

4.10 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural

Para a determinação da concentração dos compostos tóxicos como o furfural e hidroximetilfurfural, as amostras foram filtradas em membrana HAWP 0,45 µm (MILLIPORE) para total remoção de partículas sólidas. O eluente foi filtrado a vácuo com membrana GVWP 0,22 µm (MILLIPORE) e, em seguida, foi degaseificado em banho de ultrassom (Microsonic SX-50) por 15 minutos.

As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido de acordo com as seguintes condições: coluna C18 (2) 5 µm 90 Å 3,9 x 300 mm, temperatura ambiente, detector de ultravioleta (SPD-20A), eluente acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético, volume da amostra injetada, 20 µL. As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural foram determinadas a partir de curvas-padrão obtidas com padrões de alta pureza (99%, SIGMA).

4.11 Determinação da concentração celular

A concentração do inóculo de ambas as espécies de leveduras e o crescimento durante as fermentações com *P. stipitis* foram determinados pela medida da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm. A concentração celular foi calculada por uma curva padrão que correlaciona a absorbância ao peso seco das células e número de células obtido em câmara de Neubauer, a partir do cultivo em meio sintético.

Durante as fermentações com *K. marxianus*, a concentração celular foi avaliada por contagem direta em câmara de Neubauer.

4.12 Determinação do pH

Os valores de pH dos hidrolisados foram analisados em pH-metro Luthon pH206.

4.13 Determinação da concentração de sólidos solúveis (Brix)

As concentrações de sólidos solúveis presentes nos hidrolisados foram determinadas por refratômetro de bancada tipo ABBE.

4.14 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da celulase foi determinada de acordo com Ghose (1987), em termos de unidades de papel filtro ("Filter Paper Unit" – FPU) por mililitro da solução enzimática original, ou seja, FPU.mL⁻¹.

Tubos de ensaio em duplicata contendo 50 mg de substrato (aproximadamente 1 x 4,55 cm de papel filtro qualitativo, 80g m², 205 µm espessura, 0,5% cinzas, poro 14 µm, permeabilidade ao ar 14 L.s⁻¹ m²), 1 mL de tampão citrato 0,05 M pH 5,25 e 0,5 mL de enzima adequadamente diluída, foram incubados a 50 °C por 60 minutos. Foram também incubados tubos-controle da enzima (0,5 ml da enzima diluída e 1,0 mL de tampão citrato), um tubo controle do substrato (filtro de papel e 1,5 mL de tampão citrato) e um tubo correspondente ao branco (1,5 mL de tampão citrato). Os tubos com os padrões de glicose continham 0,5 mL de glicose (1,0 mg /0,5 mL a 3,35 mg /0,5 mL) e 1 mL de tampão citrato.

Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 3 mL de solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) e os açúcares redutores totais foram dosados segundo o método de Miller (1959), a 540 nm, em espectrofotômetro (UV-VIS FEMTO 700 Plus). Estimou-se a concentração de enzima que liberou exatamente 2 mg de glicose (definição de FPU) durante a reação enzimática, através da equação da reta entre concentração de glicose versus o logaritmo da concentração de enzima.

4.15 Cálculos dos parâmetros fermentativos

4.15.1 Fator de conversão de glicose e xilose em etanol ($Y_{P/S}$)

O fator de conversão de xilose e glicose em etanol ($Y_{P/S}$), expresso em g.g⁻¹, foi determinado pela Equação 8:

$$Y_{p/s} = \left(\frac{\Delta P}{-\Delta S} \right) = \left(\frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \right) \quad \text{Equação (8)}$$

Em que:

P_i e P_f - concentração inicial e final de etanol;

S_i e S_f - concentração inicial e final de substrato (soma de glicose e xilose).

4.15.2 Fator de conversão de glicose e xilose em células ($Y_{x/s}$)

O fator de conversão de D-xilose em células ($Y_{x/s}$), expresso em $g \cdot g^{-1}$, foi determinado pela Equação 9:

$$Y_{x/s} = \left(\frac{\Delta x}{-\Delta S} \right) = \left(\frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \right) \quad \text{Equação (9)}$$

Em que:

X_i e X_f - concentração inicial e final de células e

S_i e S_f - concentração inicial e final de substrato (soma da glicose e xilose).

4.15.3 Produtividade volumétrica em etanol (Q_p)

A produtividade volumétrica em etanol (Q_p), expressa em $g \cdot L^{-1} \cdot h$, foi calculada pela Equação 10:

$$Q_P = \left(\frac{\Delta P}{\Delta t} \right) = \left(\frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \right) \quad \text{Equação (10)}$$

Em que:

P_i e P_b - concentração inicial e final de etanol e

t_i e t_f - tempo inicial e final da fermentação.

4.15.4 Fator de conversão da celulose em etanol ($Y_{E/C}$)

O fator de conversão de celulose em etanol ($Y_{E/C}$), expresso em $g \cdot L^{-1}$, foi determinado pela Equação 11:

$$Y_{E/C} = \left(\frac{\Delta P}{-\Delta S} \right) = \left(\frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \right) \quad \text{Equação (11)}$$

Em que:

P_i e P_f - concentração inicial e final de etanol.

S_i e S_f - concentração inicial e final de substrato (soma de celulose).

4.15.5 Máximo teórico em etanol (%)

Máximo teórico em etanol $Y_{E/C} * 100$

4.15.6 Conversão enzimática da celulose

A conversão enzimática durante a SSF foi calculada de acordo com a conversão enzimática da celulose (ECC) a partir da concentração final de etanol e a concentração residual de celulose. O rendimento foi considerado como a glicose disponível para fermentação a partir do pré-tratamento, com um rendimento de fermentação de 0,57 g de etanol/g de glicose, conforme a Equação 9:

$$ECC = \frac{C_{\text{final EtOH}}}{C_{\text{residual Celulose}} * 0,57} \quad \text{Equação (12)}$$

4.16 Planejamento estatístico e esquema geral dos processos de hidrólise

Os ensaios foram inteiramente casualizados, com três repetições. Na análise dos dados para determinar a melhor condição de hidrólise da hemicelulose quanto às maiores concentrações de açúcares e menores concentrações de inibidores no hidrolisado, a partir das variações de tempo e concentração de ácido, foi empregado o programa estatístico SISVAR, enquanto foi utilizado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para a comparação entre as médias.

4.17 Esquema geral da metodologia empregada nos experimentos

Na Figura 11 está demonstrada, de maneira esquemática, a metodologia utilizada no processo de produção de bioetanol a partir do subproduto da extração do óleo de girassol.

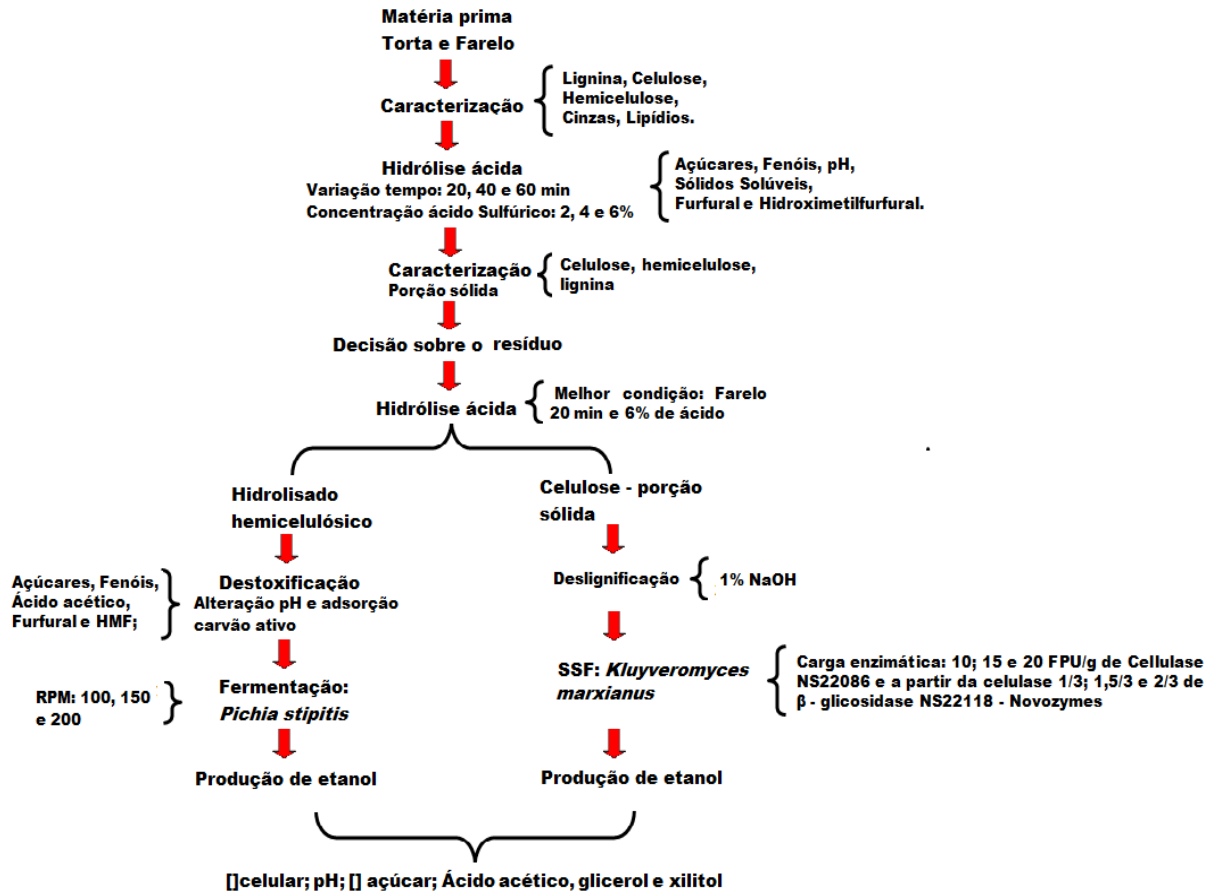


Figura 11 Esquema geral da metodologia utilizada nos experimentos para seleção do resíduo e produção de bioetanol.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da composição química da matéria prima

Considera-se que a composição química da torta e do farelo é influenciada pelos tipos de sementes, pré-tratamentos utilizados em laboratório, os quais afetam a estrutura celular, pelo tamanho, geometria das partículas, método e temperatura utilizados para extração do óleo, entre outros aspectos (PEREZ; CARELLI; CAPRISTE, 2011); por conseguinte, foi feita uma caracterização química da torta e do farelo de girassol, cujos resultados quanto aos teores de celulose, hemicelulose, lignina, lipídios e cinzas totais podem ser verificados na Tabela 2.

Tabela 2 Resultados da caracterização química (b/s) quanto aos teores de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e lipídios da torta e do farelo de girassol

	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Lipídios (%)
Torta de girassol	27,50	33,16	32,18	5,63	15,62
Farelo de girassol	32,93	30,90	26,62	5,05	1,60

Com relação à composição lignocelulósica, verifica-se que a torta apresentou 60,66% de polissacarídeos, dos quais o maior teor foi a hemicelulose (33,16%). Já no farelo, do total das fibras, 63,83% eram de polissacarídeos, dos quais a maior média (32,93%) era de celulose. As fibras lignocelulósicas encontradas na composição química do girassol são provenientes essencialmente da casca que envolve a semente (SBARTAI, SILVESTRE, RIGAL, 2008). A casca ou o pericarpo, como também é conhecida, representa até 45% do total da semente e é composta principalmente por substâncias fibrosas, em iguais proporções de lignina e materiais celulósicos (GROMPONE, 2005). Essa afirmação está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, pois os resultados para lignina e celulose foram próximos entre si.

Ainda ao serem comparados os valores obtidos de celulose e hemicelulose (Tabela 2) no presente trabalho, para a torta e o farelo de girassol, verifica-se que os dados estão próximos aos relatados na literatura para diferentes resíduos estudados para bioprocessos. Assim como o farelo de girassol, no bagaço da cana-de-açúcar, a maior porcentagem foi de celulose (40,19%), seguida pela hemicelulose (26,42%) (NEUREITER et al. 2000). A casca de aveia apresentou média semelhante aos valores relatados nesse estudo (29,26% de celulose e 28,35% de hemicelulose) (TAMANINI, HAULY 2004). Para a palha de sorgo, assim como a torta de girassol, a maior porcentagem foi de hemicelulose em relação à

celulose (34% de celulose e 44% de hemicelulose) (HERRERA et al. 2004).

Os valores de lignina em ambos os casos foram considerados elevados quando comparados às matérias-primas relatadas em outros trabalhos (bagaço de cana-de-açúcar: 22,1% GOUVEIA et al. 2009; palha de trigo: 19,6% HAN et al. 2009; palha de arroz: 17,2% MUSSATTO; ROBERTO 2002). Para a torta residual proveniente do processamento de azeite de oliva, que também é um resíduo oleaginoso como o estudado no presente trabalho, Asli; Qatibi (2009) também encontraram alta concentração de lignina (28,1%). Ainda verifica-se que a torta de girassol apresentou 5,56% a mais de lignina em relação ao farelo de girassol.

A desvantagem de a biomassa possuir altas concentrações de lignina é que, de maneira geral, quanto maior a proporção da mesma, menor é a biodisponibilidade do substrato para a geração de bioetanol, pois a celulose, a lignina e a hemicelulose estão intimamente inter-relacionadas e associadas. Contudo, a lignina é considerada a “cola” que mantém unidos os três polímeros à parede celular da planta (SANNIGRAHI; PU; RAGAUSKAS, 2010). A lignina ainda prejudica o processo fermentativo, visto que sua hidrólise libera vários compostos químicos, tais como os fenóis, que podem ser inibitórios ao metabolismo dos microrganismos. Além disso, afeta a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, pois forma uma barreira física que limita a eficiência das enzimas (YOSHIDA et al., 2008).

Quanto ao conteúdo de cinzas (Tabela 2), os valores presentes neste trabalho foram de 5,05% e 5,63%, respectivamente, para a torta e o farelo de girassol. Isso demonstra a presença de matéria inorgânica dentro da faixa normalmente encontrada em outros resíduos. Resultados de cinzas parecidos aos deste trabalho foram obtidos por Balan et al., (2009) para a torta de girassol (7,2% de cinzas); por Martin et al. (2007), para a casca de amendoim (7,5% de cinzas) e por Pinto et al., (2005), para as sementes de *Bauhinia variegata*, as quais pertencem à família das leguminosas (4,40% cinzas).

Outro ponto relevante observado na Tabela 2 é a menor concentração de lipídios (1,60%) encontrada no farelo, assim como era esperado, pois o método que utiliza solvente é mais eficiente para extração daqueles em relação ao método de prensagem que resultou na torta. O fato de o óleo ser extraído por meio de cozimento e uso de solvente, normalmente o hexano, faz com que o farelo de girassol apresente baixo teor de lipídios, em torno de 1,5% na matéria seca (OLIVEIRA et al., 2007).

Os resultados encontrados demonstram boas perspectivas para o emprego de ambos os resíduos em bioprocessos, principalmente o farelo, pois esse é constituído por um percentual maior de celulose (32,93%). Assim, o torna adequado para a realização da etapa de SSF, na qual a celulose será hidrolisada enzimaticamente em açúcares e esses são simultaneamente fermentados a etanol. O teor de hemicelulose no farelo é menor do que na torta, mas ainda pode ser considerado boa fonte de pentoses. Além disso, o farelo

possui menor concentração de lignina (26,62%) em relação à torta. No entanto, o pré-tratamento para remoção da lignina é recomendado para ambos os resíduos de forma a se obterem rendimentos mais elevados de bioetanol.

5.2 Avaliação das condições de hidrólise da fração hemicelulósica

5.2.1 Concentração de pH, açúcares e sólidos solúveis formados durante a hidrólise ácida da fração hemicelulósica

A análise de variância e o teste de Tukey empregados para os resultados dos hidrolisados provenientes do planejamento estatístico, no qual houve variação do tempo de hidrólise e da concentração de ácido sulfúrico, podem ser conferidos nas Tabelas 3 e 4, para a torta e o farelo de girassol, respectivamente.

Tabela 3 Valores de pH e concentração de D-xilose, D-glicose, L-arabinose e sólidos solúveis nos hidrolisados hemicelulósicos de torta de girassol em função da variação da concentração de ácido sulfúrico e do tempo de hidrólise

Trats	Ácido (%)	Tempos (min)	pH	D-Xilose (g.L ⁻¹)	D-Glicose (g.L ⁻¹)	L-Arabinose (g.L ⁻¹)	Sólidos solúveis (°Brix)
T1	1	20	1,72 a	1,95 i	1,49 h	0,95 e	4,10 b
T2	2	20	1,22 a	5,37 g	1,23 h	1,08 e	5,05 ab
T3	4	20	0,97 a	11,83 e	6,96 f	1,82 d	6,50 ab
T4	6	20	0,76 a	25,81 a	21,96 a	6,52 a	8,50 a
T5	1	40	1,66 a	3,72 h	1,06 h	0,15 f	4,00 b
T6	2	40	1,18 a	5,92 f	1,11 h	0,19 f	5,50 ab
T7	4	40	0,94 a	15,42 e	8,99 e	1,65 d	8,00 ab
T8	6	40	0,75 a	23,59 c	15,57 c	3,49 c	8,95 a
T9	1	60	1,44 a	3,76 h	0,82 h	0,15 f	4,50 ab
T10	2	60	1,07 a	8,30 e	3,34 g	1,72 d	6,25 ab
T11	4	60	0,88 a	22,45 d	11,86 d	5,27 b	7,25 ab
T12	6	60	0,74 a	24,56 b	16,51 b	3,55 c	9,00 a
C.V.	-	-	10,6	2,05	3,46	2,73	1,91

NOTA: Médias seguidas de letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa, Tukey 5% de probabilidade. Trat: tratamento; C.V.: coeficiente de variação.

Percebe-se de maneira geral que os resultados sofreram influência significativa das variáveis analisadas em cada tratamento. Os valores de pH dos hidrolisados hemicelulósicos, tanto da torta como do farelo, não foram maiores que 2 e diminuíram em razão do aumento da concentração do ácido. O pH baixo é proveniente da liberação de íons H^+ do ácido sulfúrico e do aumento de ácidos orgânicos como acético, liberado da cadeia lateral da hemicelulose durante a hidrólise, conforme discutido posteriormente. Embora não haja diferença significativa para os tratamentos, percebe-se que essa variação foi devido às concentrações utilizadas do ácido (1; 2; 4 e 6%).

Tabela 4 Valores de pH e concentração de D-xilose, D-glicose, L-arabinose e sólidos solúveis nos hidrolisados hemicelulósicos de farelo de girassol em função da variação da concentração de ácido sulfúrico e do tempo de hidrólise.

Trat	Ácido (%)	Tempo (min)	pH	D-Xilose (g.L ⁻¹)	D-Glicose (g.L ⁻¹)	L-Arabinose (g.L ⁻¹)	Sólidos solúveis (°Brix)
F1	1	20	1,45 a	1,36 g	2,83 f	0,67 i	3,60 c
F2	2	20	1,14 a	6,70 f	1,51 g	2,70 g	4,85 c
F3	4	20	0,94 a	16,06 e	6,22 e	5,05 d	7,25 abc
F4	6	20	0,84 a	24,88 c	22,33 a	8,90 a	8,50 a
F5	1	40	1,70 a	1,90 g	1,47 g	1,15 hi	3,10 d
F6	2	40	1,18 a	9,59 e	5,54 e	3,62 f	5,75 c
F7	4	40	0,90 a	28,71 a	9,34 c	4,84 d	7,75 ab
F8	6	40	0,74 a	26,69 b	14,73 b	6,42 c	8,85 a
F9	1	60	1,58 a	1,72 g	1,62 g	1,53 h	5,75 c
F10	2	60	2,05 a	9,18 e	2,73 f	4,45 e	6,35 bc
F11	4	60	0,90 a	25,14 c	7,64 d	7,30 b	8,00 ab
F12	6	60	0,76 a	20,27 d	14,60 b	9,27 a	9,00 a
C.V.	-	-	11,8	3,43	4,89	3,57	1,91

NOTA: Médias seguidas de letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa, Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Trat: tratamento; C.V.: coeficiente de variação.

Com relação aos açúcares monoméricos, verifica-se que a porção hemicelulósica mostrou-se sensível ao processo de hidrólise, pois a xilose foi predominante em todos os tratamentos. Além disso, as concentrações de todos os açúcares apresentaram diferença estatística na medida em que a concentração do ácido aumentava. Esse parâmetro é de grande importância, pois a soma total de açúcares, ou seja, xilose, glicose e arabinose,

aproxima-se de 50 g.L⁻¹. A concentração de xilose de 50 g.L⁻¹ foi encontrada como máxima tolerada na fermentação por *P. stipitis* a etanol (DU-PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986). Em trabalho realizado por Saraçoglu, Çavusoglu (1999), os autores verificaram que o aumento na concentração de xilose de 50 para 100 g.L⁻¹ diminuiu tanto o crescimento como a produção de xilitol por *Candida tropicalis* em hidrolisado da casca da semente de girassol. A partir dos estudos relatados, é importante considerar que as concentrações de açúcares do hidrolisado estejam próximas de 50 g.L⁻¹ em bioprocessos que empregam microrganismos fermentadores de pentoses, a fim de que não ocorra redução nos rendimentos.

No hidrolisado proveniente da torta (Tabela 3), verifica-se que o aumento da concentração do ácido (6%) para os diferentes tempos proporcionou as maiores médias de xilose, glicose e arabinose. O tratamento com 20 minutos e 6% de ácido sulfúrico apresentou a maior concentração de todos os açúcares e diferiu estatisticamente em nível de 5% de significância dos outros tratamentos.

Vale ressaltar que os tratamentos com os tempos de 40 e 60 minutos e com 6% de ácido apresentaram uma pequena redução nas médias quando comparados à mesma concentração do ácido e menor tempo. E, embora apresentem diferença estatística significativa, possuem concentrações de açúcares ainda consideradas elevadas, as quais poderiam ser utilizadas como substrato em processos fermentativos. Porém, como a concentração do ácido empregado foi a mesma, provavelmente essa redução dos açúcares, conforme o aumento do tempo, deve-se à degradação desses açúcares em compostos de menor peso molecular como furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético. Assim, é importante a avaliação da concentração desses, visto que os valores elevados podem ser inibitórios aos microrganismos.

Para o farelo (Tabela 4), verificou-se um comportamento semelhante à torta, ou seja, o aumento do ácido proporcionou maior liberação dos monossacarídeos e os tratamentos com 6% de ácido apresentaram as mais altas concentrações de açúcares. Ainda o farelo foi mais sensível à ação do ácido que a torta, pois as médias dos açúcares foram mais elevadas com concentração mais baixa do ácido, dados ressaltados com a maior média de xilose (28,71 g.L⁻¹), obtida com 4% do ácido (4%) e 40 minutos, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com Akpinar et al., (2011), que afirmam que a concentração do ácido é o parâmetro mais importante que afeta o rendimento de açúcar. A taxa de hidrólise da xilana ocorre muito mais rapidamente do que a da celulose e é aumentada com a concentração do ácido, conforme a temperatura, (MALONEY; CHAPMAN; BAKER, 1985). O mesmo comportamento foi observado neste trabalho.

Vale ressaltar que tanto a torta como o farelo apresentaram elevadas concentrações de glicose no hidrolisado e as médias aumentaram em função da concentração do ácido e

do tempo empregados. As elevadas médias de glicose encontradas neste trabalho podem ser provenientes do amido residual das sementes, dados também constatados por Moraes (2008) para o hidrolisado hemicelulósico da palha de cevada, o qual continha 21,35 g.L⁻¹ de xilose e 7,23 g.L⁻¹ de glicose. Martin et al. (2007), ao realizarem a hidrólise da casca de arroz com ácido sulfúrico (2%), também encontraram elevadas concentrações de glicose no hidrolisado (26; 29 e 33,5 g.L⁻¹ com 20, 40 e 60 minutos de hidrólise, respectivamente). Isso foi atribuído à hidrólise do amido residual presente na casca.

Outra possibilidade é que a glicose seja proveniente da hidrólise da celulose amorfa, pois, embora a hemicelulose seja mais facilmente hidrolisada através de hidrólise ácida branda, a estrutura da fibra de celulose é passível de hidrólise, pois não é uniforme em toda extensão. Existem regiões cristalinas e organizadas e outras regiões amorfas que, durante o processo de hidrólise ácida, são hidrolisadas em diferentes velocidades. Para as regiões amorfas, são utilizados tratamentos brandos, todavia, para as regiões cristalinas, são necessários processos drásticos (GURGEL, 2010).

Outra possibilidade para a concentração elevada de glicose verificada nos tratamentos mais drásticos é que parte dela pode ter sido proveniente da hemicelulose, visto que, embora essa porção da fibra seja composta principalmente por pentoses, as hexoses estão em menor quantidade, incluindo a glicose. Como não se conhece o valor real de glicose no farelo e na torta, seriam necessárias análises mais detalhadas para determinar o quanto desta hexose está presente na hemicelulose. Sun; Cheng, (2005) encontraram 33% de glicose no hidrolisado de grama-bermuda (feno) pré-tratado com 1,2% ácido sulfúrico durante 90 minutos e afirmam que essa concentração de glicose obtida pode ter sido proveniente da estrutura da hemicelulose, que foi hidrolisada juntamente com a xilana.

Observa-se também nas Tabelas 3 e 4 que os valores de sólidos solúveis aumentaram conforme aumentava a concentração do ácido. As maiores médias para a torta (8; 8,95 e 9^oBrix) e para o farelo (8; 8,5 e 9^oBrix) foram estatisticamente iguais entre si para os tempos 20, 40 e 60 minutos, na concentração de 6% de ácido. Os compostos solúveis são determinados a partir da soma do total dos compostos dissolvidos na solução, tais como açúcares, sal, proteínas, dentre outros.

A palha de sorgo mostrou-se mais fácil de ser hidrolisada com concentrações menores de ácido do que a torta e o farelo, pois Téllez-Luis; Ramirez; Vázquez (2002), ao estudarem a hidrólise da palha de sorgo com diferentes concentrações de ácido sulfúrico, obtiveram valor de 19 g.L⁻¹ de xilose com 2% de ácido por 60 minutos, todavia, com o aumento da concentração de ácido de 4 e 6%, os valores obtidos não foram superiores a 17 g.L⁻¹. Os mesmos autores sugerem que as reações de degradação são reforçadas pela concentração de ácido. Nesse mesmo trabalho, foram verificados, para a palha de sorgo, teores de 35% de celulose, 23,96% de hemicelulose e 25,41% de lignina.

Najafpour et al., (2007) verificaram no processo de hidrólise ácida dos resíduos sólidos provenientes da extração do óleo de palma, resíduo que assim como a torta e o farelo apresenta alto teor de extrato etéreo, que as altas concentrações de ácido clorídrico melhoraram a taxa de reação e rendimento de açúcares e, por 40 minutos, com 5% de sólidos e 15, 20, 25 e 30% de ácido, obtiveram conversões de 36, 60, 65 e 80% em açúcares, respectivamente.

5.2.2 Compostos tóxicos formados durante a hidrólise ácida da fração hemicelulósica

Com relação aos subprodutos da degradação da celulose, hemicelulose e lignina, que podem ser tóxicos aos microrganismos no processo fermentativo, esses foram monitorados no presente trabalho e os resultados para os diferentes tratamentos podem ser verificados na Tabela 5 (hidrolisado de torta) e Tabela 6 (hidrolisado de farelo).

Tabela 5 Concentração de fenóis, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) nos hidrolisados hemicelulósicos de torta de girassol em função da variação da concentração de ácido sulfúrico e do tempo de hidrólise

Trats	Ácido (%)	Tempos (min)	Fenóis (g.L ⁻¹)	Ácido acético (g.L ⁻¹)	Furfural (g. L ⁻¹)	HMF (g. L ⁻¹)
T1	1	20	1,86 e	0,07 f	0,0250 de	0,0015 b
T2	2	20	2,13 d	0,46 de	0,0542 ab	0,0057 b
T3	4	20	2,23 cd	0,54 d	0,0439 bc	0,0260 b
T4	6	20	2,44 bc	0,50 de	0,0352 cd	0,0298 b
T5	1	40	2,14 d	0,45 de	0,0222 e	0,0089 b
T6	2	40	2,45 bc	0,52 d	0,0528 ab	0,0353 b
T7	4	40	2,66 ab	1,08 b	0,0271 de	0,0796 a
T8	6	40	2,69 a	1,45 a	0,0637 a	0,0889 a
T9	1	60	1,81 e	0,35 e	0,0169 e	0,0081 b
T10	2	60	2,15 d	0,88 c	0,521 ab	0,0330 b
T11	4	60	2,18 d	0,97 bc	0,0595 a	0,0896 a
T12	6	60	2,41c	1,31 a	0,0599 a	0,0894 a
C.V.	-	-	2,42	5,59	6,75	20,75

NOTA: Médias seguidas de letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Trat: tratamento; CV.: coeficiente de variação.

Para os hidrolisados provenientes da torta, verifica-se que o tratamento 8 (6% H₂SO₄, 40 minutos) obteve-se a maior concentração de fenóis (2,69 g.L⁻¹), de ácido acético

(1,45 g.L⁻¹), furfural (0,0637 g.L⁻¹) e hidroximetilfurfural (0,0889 g.L⁻¹).

Ainda é possível considerar que no hidrolisado da torta (Tabela 5), nas condições com 2, 4 e 6% de ácido e tempo de hidrólise superior a 40 minutos, foram encontradas médias relativamente elevadas de ácido acético e furfural. Neste caso, verifica-se que em concentração elevada de ácido e tempo de hidrólise acontece a degradação das pentoses em seus constituintes de menor peso molecular.

Quanto ao teor de hidroximetilfurfural no hidrolisado da torta, o tratamento 8 foi estatisticamente igual ao T₇ (4% H₂SO₄, 40 minutos), T₁₁ e T₁₂ (6% H₂SO₄, 40 e 60 minutos). Isso mostra que a maior concentração do ácido e maior tempo de hidrólise em autoclave propiciaram a degradação da glicose a hidroximetilfurfural.

Tabela 6 Concentração de fenóis, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) nos hidrolisados hemicelulósicos de farelo de girassol em função da variação da concentração do ácido sulfúrico e do tempo de hidrólise

Trats	Ácido (%)	Tempos (min)	Fenóis (g.L ⁻¹)	Ácido acético (g.L ⁻¹)	Furfural (g.L ⁻¹)	HMF (g.L ⁻¹)
F1	1	20	1,16 i	0,25 fg	0,0022 d	0,0586 ab
F2	2	20	1,42 gh	0,44 e	0,0199 c	0,0539 ab
F3	4	20	1,32 hi	0,51 e	0,0132 cd	0,0386 b
F4	6	20	1,59 g	1,93 b	0,0182 c	0,0514 ab
F5	1	40	1,88 f	0,37 ef	0,0040 cd	0,0549 ab
F6	2	40	1,83 f	0,80 d	0,0127 cd	0,0562 ab
F7	4	40	2,13 de	1,54 c	0,0313 b	0,0825 ab
F8	6	40	2,83 c	2,19 a	0,0428 a	0,0823 ab
F9	1	60	1,95 ef	0,19 g	0,0019 d	0,0711 ab
F10	2	60	2,34 d	0,50 e	0,0075 de	0,0540 ab
F11	4	60	3,70 b	0,81 d	0,0210 c	0,0859 ab
F12	6	60	3,94 a	2,30 a	0,0327 b	0,0898 a
C.V.	-	-	2,48	4,26	14,28	19,22

NOTA: Médias seguidas de letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Trat: tratamento; CV.: coeficiente de variação.

Para o farelo (Tabela 6), a concentração mais elevada de fenóis (3,94 g.L⁻¹) foi obtida no F₁₂ (6% H₂SO₄, 60 minutos) e demonstra que a condição mais drástica promoveu a maior degradação da lignina em seu subproduto. Para o ácido acético, os valores 2,30 e 2,19 g.L⁻¹ foram estatisticamente iguais nos tratamentos F₁₂ e F₈ (6% H₂SO₄, 60 minutos e

6% H₂SO₄, 40 minutos). Para o furfural, a maior concentração (0,0428 g.L⁻¹) foi obtida no tratamento F₈ (6% H₂SO₄, 40 minutos). Portanto, concentrações elevadas de ácido e tempos mais longos de hidrólise promoveram a desidratação das pentoses, uma vez que as concentrações de furfural e ácido acético aumentaram.

Ainda em relação ao hidrolisado de farelo (Tabela 6), o tratamento F₁₂ (6% H₂SO₄, 60 minutos) apresentou maior valor para o hidroximetilfurfural (0,0898 g.L⁻¹). Esses dados conferem com os de Macedo et al., (2011) que, ao avaliarem o processo de hidrólise ácida do farelo de pequi, resíduo proveniente da extração de biodiesel, mostraram que em concentrações de H₂SO₄ maiores que 4%, a degradação dos açúcares começa a ocorrer, dos quais inclui-se a glicose.

Maiores teores de fenóis (12,33 g.L⁻¹) e de ácido acético (3,92 g.L⁻¹) e menores concentrações de furfural (0,013 g.L⁻¹) e de hidroximetilfurfural (0,019 g.L⁻¹) foram encontrados no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, após a hidrólise a 121 °C por 10 minutos com 100 mg de H₂SO₄ em uma relação de 1:10 (matéria seca para solução ácida) (CARVALHO et al. 2005). Porém, Martin et al. (2007) encontraram, no hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar com 60 minutos de hidrólise e 2% de ácido sulfúrico por 122 °C com uma relação sólido-líquido 1:10, médias semelhantes de fenóis (2,24 g.L⁻¹), ácido acético (2,7 g.L⁻¹); hidroximetilfurfural (0,07 g.L⁻¹) e superiores para furfural (0,36 g.L⁻¹) em relação às obtidas no presente trabalho.

As concentrações normalmente encontradas em hidrolisados variam de 1 a 10 g.L⁻¹ de ácido acético, 0 a 5 g.L⁻¹ de furfural e hidroximetilfurfural e 0 a 3 g.L⁻¹ de compostos fenólicos. Porém, esses compostos, mesmo em baixas concentrações em hidrolisados, podem inibir a fermentação (PARAJÓ et al., 1998). Além disso, a toxicidade dos inibidores depende de características como concentração, tipo de organismo, modo e condições de cultivo (CHANDEL et al., 2007).

Haja vista os teores de compostos tóxicos nos hidrolisados deste trabalho estarem na faixa que não causariam grandes prejuízos aos microrganismos, vale ressaltar que a ação sinérgica dos compostos tóxicos poderia interferir no processo fermentativo e diminuir os rendimentos; portanto, recomenda-se o processo de destoxificação a fim de melhorar o processo fermentativo.

Como pode ser verificado no hidrolisado da torta, (Tabela 3) houve redução da glicose em 29,09% (6% de H₂SO₄ e 40 minutos) e 24,81% (6% de H₂SO₄ e 60 minutos) em relação ao tratamento com 6% de ácido e 20 minutos. Para o hidrolisado do farelo (Tabela 4), a redução no valor de glicose ficou em torno de 34% para os tratamentos mais extremos (6% H₂SO₄ com 40 e 60 minutos) em relação ao tratamento com 6% H₂SO₄ e 20 minutos. O aumento na concentração do ácido proporcionou as mais altas médias de açúcares, tanto para torta como para o farelo, porém com o aumento no tempo de autoclave, como consequência, houve redução de glicose e xilose devido à decomposição desses açúcares

e ao aumento de seus respectivos inibidores, confirmado pela análise dos compostos tóxicos deste hidrolisado.

O tratamento T₄ apresentou maior concentração de açúcares (Tabela 3) e mostrou ser o melhor tratamento para utilização da torta e obtenção de produtos de interesse comercial como etanol e xilitol a partir de pentoses, pois indica que as condições de hidrólise foram adequadas para a extração da fração hemicelulósica, com concentrações menores de furfural e de hidroximetilfural.

Verifica-se que o tratamento F₄ (6% H₂SO₄, 20 minutos) para o farelo de girassol (Tabela 4) proporcionou elevadas concentrações de glicose e arabinose em relação a outros tratamentos. Embora não seja este o tratamento que apresente maior concentração, a xilose ainda encontra-se elevada (24,88 g.L⁻¹). As concentrações dos tóxicos como ácido acético (1,93 g.L⁻¹) e furfural (0,0182 g.L⁻¹) não são tão expressivas quanto às encontradas nos tratamentos mais severos. Além disso, o menor tempo hidrólise é um fator importante na escolha do processo que visa à economia.

A utilização do hidrolisado hemicelulósico de torta e farelo de girassol como fonte de pentoses em bioprocessos demonstra-se promissora em razão dos resultados obtidos de açúcares e compostos tóxicos. Considerando as concentrações altas de xilose e glicose no hidrolisado, esse demonstra ser um meio de cultivo promissor para bioprocessos, com a vantagem de não necessitar da etapa de concentração a vácuo a fim de aumentar a quantidade dos açúcares fermentáveis, o que representa economia. Além disso, tem sido constatado um aumento proporcional nos compostos inibitórios durante o procedimento de concentração dos açúcares em hidrolisados de outras biomassas. Pois, isso poderia prejudicar os processos fermentativos e aumentar os custos com destoxificação.

5.2.3 Caracterização química da porção sólida residual

As porções sólidas residuais dos diferentes tratamentos de hidrólise ácida para remoção da hemicelulose, realizadas segundo o planejamento estatístico, tanto para o farelo como para a torta, foram caracterizadas quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina, conforme metodologia validada por Gouveia et al. (2009). Dessa forma, foi possível analisar a condição que resultou em um material rico em celulose a ser destinado ao processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) para a produção de etanol a partir de hexoses. Os resultados obtidos para torta e farelo de girassol encontram-se dispostos nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

De maneira geral, observa-se nas Tabelas 7 e 8 que as porcentagens de hemicelulose residual da biomassa da torta e farelo diminuem consideravelmente conforme aumentam tanto a concentração empregada do ácido como o tempo de hidrólise, o que é indicativo da eficiência do tratamento ácido em remover pentoses. As condições de hidrólise

mais brandas resultaram em um maior teor de hemicelulose residual, cujo resíduo é formado basicamente por celulose e lignina, denominado de celulignina. Segundo Zheng, Pan, Zhang (2009), ao realizarem o tratamento com ácido diluído, o sacarídeo hemicelulósico oligomérico pode ser completamente hidrolisado em monossacarídeos por ajuste condições pré-tratamento.

Para a biomassa proveniente da torta, a quantidade de celulose e lignina foi alterada conforme as condições de ácido e o tempo de autoclave utilizados. Porém, T₄ (6 H₂SO₄ e 20 minutos) resultou na menor média (28,11%) de celulose na fração sólida (Tabela 7). Os dados sugerem que, como o hidrolisado hemicelulósico apresentava elevadas concentrações de glicose (Tabela 5), essa poderia ser proveniente da fração celulósica que foi parcialmente degradada.

Tabela 7 Teores de celulose, hemicelulose, lignina na biomassa sólida residual da torta de girassol após a hidrólise ácida com variação das concentrações de ácido sulfúrico e do tempo de hidrólise

Trats	Ácido (%)	Tempo (min)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
T1	1	20	36,4	10,68	43,84
T2	2	20	36,87	4,77	42,00
T3	4	20	33,58	4,25	36,22
T4	6	20	28,11	0,97	37,00
T5	1	40	37,40	8,48	46,14
T6	2	40	37,21	5,48	37,02
T7	4	40	32,11	4,60	37,3
T8	6	40	26,76	1,40	35,22
T9	1	60	28,69	8,44	42,9
T10	2	60	30,76	5,24	39,98
T11	4	60	34,66	5,35	42,94
T12	6	60	32,18	1,54	36,17

No que tange ao farelo, o tratamento F₇ (4% H₂SO₄, 40 minutos) foi o que menos degradou a lignina e manteve uma porcentagem média de 44,10%. Embora a variação para a celulose seja menor, percebe-se que quanto maior foi a concentração do ácido, foi maior a sua degradação em glicose em seus constituintes de menor peso molecular como hidroximetilfurfural. E o tratamento com 4% de H₂SO₄ e 40 minutos proporcionou menor porcentagem média de celulose.

As elevadas porcentagens de celulose residual verificadas em algumas condições

de hidrólise indicam boas possibilidades de emprego do farelo como biomassa celulósica em bioprocessos para a produção de etanol de segunda geração. O tratamento que mais se mostrou adequado foi F₄ (6% de H₂SO₄, 20 minutos) para o farelo, pois proporciona uma concentração de celulose relativamente alta e concentrações menores de lignina. Esta porção da fibra é interessante, visto que será a biomassa utilizada para hidrólise enzimática durante o processo SSF para produção de bioetanol na etapa seguinte do projeto, embora seja ressaltada a importância de um pré-tratamento para remoção parcial ou total da lignina a fim de aumentar os rendimentos.

Tabela 8 Teores de celulose, hemicelulose, lignina na biomassa sólida residual de farelo de girassol após a hidrólise ácida com das concentrações de ácido sulfúrico e do tempo de hidrólise

Trats	Ácido (%)	Tempo (min)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
F1	1	20	34,83	23,20	39,66
F2	2	20	39,47	15,55	36,66
F3	4	20	39,71	1,48	37,02
F4	6	20	33,41	0,22	30,52
F5	1	40	44,29	6,72	36,02
F6	2	40	46,30	1,42	38,00
F7	4	40	31,35	1,06	44,10
F8	6	40	29,77	0,52	40,05
F9	1	60	32,23	1,72	36,52
F10	2	60	30,73	1,30	43,40
F11	4	60	26,75	0,94	45,80
F12	6	60	28,55	0,40	43,20

5.2.4 Determinação da recuperação das pentoses

Foi realizada uma análise comparativa entre a torta e o farelo quanto à porcentagem de recuperação das pentoses provenientes da hemicelulose com o objetivo de escolher qual seria o resíduo mais adequado para produção de bioetanol, tanto a partir da fração hemicelulósica quanto da fração celulósica.

Na Figura 12 percebe-se que o farelo apresentou, na maioria dos tratamentos, as maiores porcentagens de pentoses em relação à torta. O tratamento que permitiu a maior porcentagem de recuperação de pentosanas para o farelo foi o F₄ (6% H₂SO₄, 20 minutos), ou seja, 90,27%, enquanto a mesma condição de hidrólise também foi a que apresentou

maior valor, para a torta, com média de 85,80%.

De modo geral, percebeu-se que o fator de maior importância foi a variação da concentração do ácido com relação ao tratamento que propiciasse um hidrolisado hemicelulósico com altas concentrações de pentoses, para utilização na fermentação por *P. stipitis*. Pois, observou-se a tendência em liberar os monossacarídeos conforme aumentava a concentração do mesmo. Nesse caso, para economia do processo, o menor tempo respondeu de maneira significativa à concentração de pentoses para o processo fermentativo, visto que com 6% de ácido sulfúrico e com 20 minutos foram obtidas as maiores concentrações de pentoses (24,88% de xilose e 22,33% de glicose) (Tabela 6). A partir desse contexto, o resíduo escolhido para obtenção do hidrolisado hemicelulósico foi o farelo, o tratamento 6% de ácido sulfúrico e tempo de 20 minutos. Esse mesmo tratamento resultou em alta fração de biomassa celulósica (33,41%) (Tabela 8) a ser utilizada na etapa de SSF com *K. marxianus*.

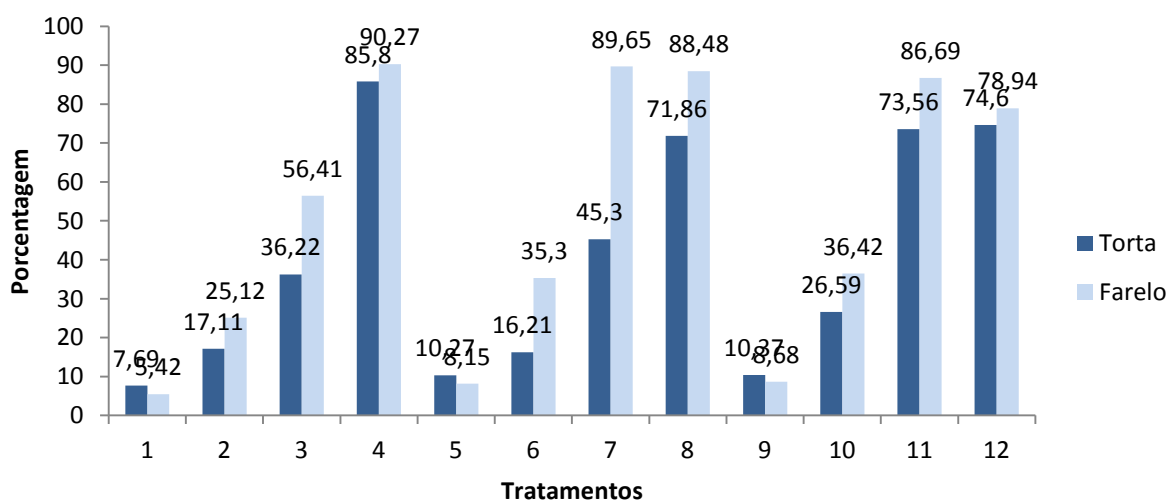


Figura 12 Comparação entre a porcentagem de recuperação de pentoses entre os diferentes tratamentos de hidrólise ácida da torta e do farelo de girassol

Vale ressaltar que, embora o resíduo selecionado tenha sido o farelo, a torta também apresentou resultados interessantes e com boas possibilidades de emprego em bioprocessos. Por conseguinte, estudos futuros devem ser realizados com esse resíduo a fim de agregar valor a sua cadeia produtiva e propiciar um destino adequado devido à grande quantidade gerada no processo de produção de óleo e biodiesel.

5.3 Tratamento do hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol

No presente trabalho, após a escolha do resíduo, foi realizada nova hidrólise ácida do farelo na condição selecionada (H_2SO_4 6%, 20 minutos) de forma a se obter o volume

necessário de hidrolisado para as fermentações de pentoses bem como a biomassa celulósica para a SSF. O hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol foi destoxificado com alteração de pH e a absorção com carvão ativo. Os resultados verificados para glicose, xilose, arabinose, fenóis, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural para o hidrolisado *in natura* e destoxificado encontram-se na Tabela 9.

Foi possível verificar que os compostos tóxicos foram parcialmente removidos de acordo com os valores obtidos, com remoção de 30 a 70%, considerada como a máxima para o ácido acético. No caso dos açúcares, foi também verificada a redução dos referidos teores, com variação de 9,26 a 21,04%, considerada como a máxima para a arabinose. Em relação ao furfural e hidroximetilfurfural, após o processo de destoxificação, provavelmente, os mesmos não foram detectados por estarem abaixo do limite de detecção do equipamento.

Tabela 9 Concentrações de D-xilose, D-glicose, L-arabinose, fenóis, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol *in natura* e destoxificado obtido por hidrólise ácida empregando 6% H₂SO₄ por 20 minutos

	Hidrolisado <i>in natura</i>	Hidrolisado destoxificado	% Removida
Glicose (g.L ⁻¹)	24,98	20,66	17,00
Xilose (g.L ⁻¹)	26,55	24,09	9,26
Arabinose (g.L ⁻¹)	6,51	5,14	21,04
Fenóis (g.L ⁻¹)	3,04	2,10	30,00
Ácido acético (g.L ⁻¹)	0,58	0,13	77,58
Furfural (g.L ⁻¹)	0,04	N.d.	-
Hidroximetilfurfural (g.L ⁻¹)	0,09	N.d.	-

Nota: N.d. não detectado

No artigo de revisão de Mills; Sandoval; Gill (2009), os autores descrevem que os ácidos fracos, como acético, afetam a célula pela sua entrada e alteração de pH intracelular. No entanto, os furanos se caracterizam por impedir a função enzimática durante a fermentação, enquanto os fenóis atrapalham as membranas e interferem com a função de alvos intracelulares hidrofóbicos.

Em cultivo de *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 para a produção de etanol, concentrações superiores a 1,5 g.L⁻¹ de furfural no meio fermentativo interferiram de maneira negativa na respiração e no crescimento da levedura, porém em concentrações de 0,25 g.L⁻¹ não ocorreu a interferência no rendimento e na produtividade (NIGAM, 2001). Para a *Pichia stipitis* DSM 3651, a concentração de 3,5 g.L⁻¹ de ácido acético inibiu a produção de etanol porém, 2 g.L⁻¹ de furfural inibiram o consumo de xilose (BELLIDO et al. 2011).

No presente trabalho, após a destoxificação do hidrolisado, foram verificadas concentrações mais baixas de compostos tóxicos e que possivelmente não são inibitórias ao metabolismo microbiano. Todavia, é relevante considerar que concentração máxima de cada inibidor encontrado nos hidrolisados hemicelulósicos e sua tolerância por microrganismos fermentativos dependem da espécie utilizada e sua adaptação ao meio, do tipo de processo de fermentação empregado, do número de inibidores presentes no meio e do seu efeito combinado (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

5.4 Deslignificação da fração celulósica

Para melhorar a eficiência enzimática, a celulignina residual proveniente da melhor condição de hidrólise ácida (H_2SO_4 6%, 20 minutos), após lavagem e caracterização da porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina, seguiu para o processo de deslignificação com solução de 1% de NaOH. Os resultados da caracterização quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa, antes e após o processo de deslignificação, podem ser conferidos na Tabela 10.

Como podem ser verificados, quase 60% da lignina foram retirados da fibra após a deslignificação (Tabela 10), o que demonstra a eficiência do processo. De acordo com os resultados, percebe-se ainda que a fibra, após o processo de deslignificação, era composta basicamente por celulose. Assim, a mesma se torna ideal para a sacarificação simultânea à fermentação, na qual a hidrólise enzimática romperá as ligações dos polissacarídeos e liberará os monômeros de glicose. O conteúdo de hemicelulose antes do pré-tratamento com NaOH já era menor que 1%, visto que a hidrólise ácida utilizada para condição escolhida removeu quase totalmente esse composto (Tabela 8).

Tabela 10 Teores de celulose, hemicelulose, lignina na biomassa sólida residual de farelo de girassol após remoção da hemicelulose através da variação das concentrações de ácido sulfúrico e do tempo de hidrólise e posterior à deslignificação.

Composição	Sem Pré-tratamento NaOH	Pré-tratado NaOH
Celulose (%)	48	70,23
Hemicelulose (%)	0,2	0,1
Lignina (%)	35	15,82

No processo de hidrólise enzimática, a lignina restringe a hidrólise, pois esconde a superfície celulósica e impede o intumescimento das fibras, de maneira que se torna necessária uma etapa de pré-tratamento, tanto a fim de quebrar a estrutura cristalina da lignocelulose quanto para remover a lignina, expondo as moléculas de celulose à ação enzimática (OGEDA; PETRI, 2010).

O material deslignificado com NaOH apresenta as melhores conversões enzimáticas da celulose quando comparado ao material não deslignificado, pois sem hemicelulose e com menor quantidade de lignina, torna-se mais acessível à ação do complexo enzimático da celulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2007). Os procedimentos de deslignificação são importantes na produção de bioetanol, pois além de permitirem a deslignificação do material, diminuem a cristalinidade da celulose. Logo, são fundamentais para o ataque enzimático subsequente (REYES; PERALTA-ZAMORA; DURÁN, 1998).

Assim como para o farelo, o bagaço de cana-de-açúcar que antes de ser deslignificado era composto por celulose (49,89%), hemicelulose (7,99%) e lignina (34,49%), após a deslignificação com solução de 1% de NaOH, passou a ser constituído principalmente por celulose (84,20%), seguido de menor quantidade pela lignina (10,5%) e hemicelulose (3,81%) (SANTOS et al. 2010). Em estudo realizado por Goshadrou; Karimi; Taherzadeh (2011), no qual o bagaço de sorgo foi deixado por 3 horas em solução de NaOH (12% m.v⁻¹) para deslignificação, os autores verificaram que a lignina foi reduzida de 16,47% para 11,50%. Esse dado demonstra que o tratamento alcalino é eficiente para remoção da lignina.

5.5 Fermentação do hidrolisado hemicelulósico por *P. stipitis*

5.5.1 Crescimento celular

Na Figura 13 pode-se observar o crescimento celular da levedura *P. stipitis* ATCC 58376 nas rotações de 100, 150 e 200 rpm, ao longo de 72 horas, no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol, obtido por hidrólise ácida com 6% de ácido sulfúrico por 20 minutos e tratado com alteração de pH e adsorção com carvão ativo. Observa-se que, durante as primeiras 24 horas, o crescimento celular para os três tratamentos foi lento, com aumentos médios de biomassa de 0,074; 0,451 e 0,287 g.L⁻¹ a 100; 150 e 200 rpm respectivamente. Assim, há um sinal de que indica fase de adaptação ao meio de cultura em função da presença de compostos tóxicos à levedura como fenóis, os quais não foram totalmente removidos com procedimento de destoxificação empregado. Em 48 horas, as concentrações médias de biomassa foram de 0,956; 1,52 e 2,32 g.L⁻¹ a 100 rpm, 150 e 200 rpm respectivamente e demonstra a fase de divisão celular mais intensa, pois à medida que as leveduras se adaptam, começam a se multiplicar de forma mais acelerada, embora a 100 rpm tenha sido verificada uma menor velocidade de crescimento.

O favorecimento do crescimento celular com o aumento da rotação é evidenciado, cuja maior concentração de biomassa (4,91 g.L⁻¹) foi obtida com 200 rpm. É conhecido que enzimas responsáveis pela fermentação de xilose em *P. stipitis* requerem condições de microaeração (JEFFRIES, 2007). A aeração é o parâmetro de grande importância neste

bioprocesso, pois a disponibilidade de oxigênio definirá se o equilíbrio do consumo de carbono será direcionado para crescimento ou formação do produto de interesse (DUPREEZ; PRIOR, 1985). Em *P. stipitis*, as elevadas concentrações oxigênio se direcionam para produção de biomassa celular; todavia, na ausência de oxigênio, é produzido etanol (AGBOGBO; COWARD, 2008), logo, caracteriza-se o metabolismo respiratório ou fermentativo.

O favorecimento da produção de biomassa e da concentração de etanol ($12,19 \text{ g.L}^{-1}$) foi também verificado para *P. stipitis* NRRL Y-7124 quando a agitação foi aumentada de 70 para 100 rpm durante a fermentação do hidrolisado da casca de semente de girassol (TELLI-OKUR; EKEN-SARAÇOGLU, 2008).

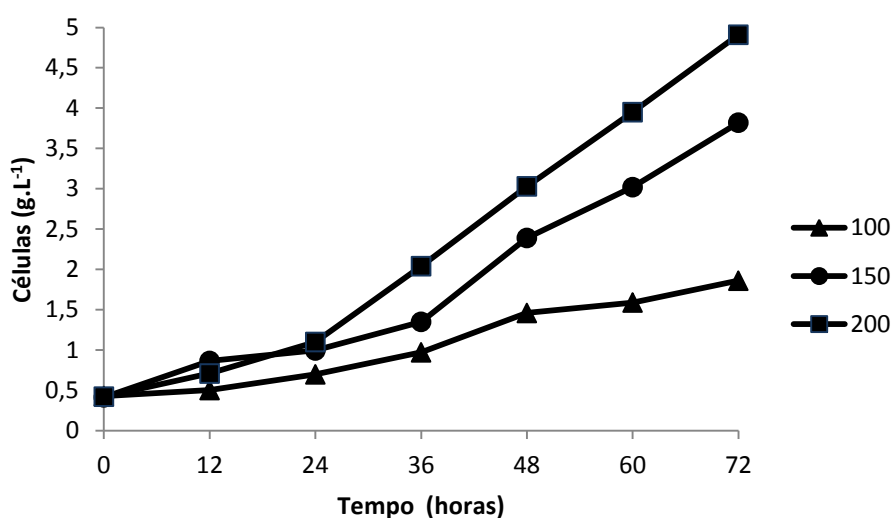


Figura 13 Concentração celular da levedura *P. stipitis* ATCC 58376 durante cultivo no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol sob agitação de 100 (▲), 150 (●) e 200 (■) rpm.

5.5.2 Variação do pH

Na Figura 14, verifica-se a variação de pH durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol pela levedura *P. stipitis* ATCC 58376, com variação da agitação de 100, 150 e 200 rpm. De acordo com o gráfico, nos três tratamentos, observa-se uma queda do pH nas primeiras horas. Para 150 e 200 rpm, a redução do pH foi verificada até as 24 horas, mas, a 100 rpm, a queda foi prolongada até 48 horas. Verifica-se ainda, para as três condições avaliadas, um aumento de pH até o final do processo (72 horas), considerado como a maior variação verificada para a condição de rotação de 200 rpm.

Observa-se que o crescimento celular e o pH foram influenciados pela agitação e se comportaram de maneira semelhante, ou seja, quanto maior o crescimento, maior foi o

aumento de pH no final do processo. As alterações de pH durante o processo fermentativo podem estar relacionadas ao consumo de compostos inibitórios, tais como o ácido acético, que era de $0,13 \text{ g.L}^{-1}$ no meio, ou formação de outros ácidos orgânicos e CO_2 .

Telli-Okur; Eken-Saraçoglu (2006), ao estudarem a influência das taxas de aeração em *P. stipitis* NRRL Y-7124 a partir de hidrolisado de casca de girassol, também verificaram que o pH, conforme o fornecimento de ar, inicialmente decresceu de 6 para 5,38, seguido de um aumento até o final da fermentação. A observação de perfis de pH diferentes relacionados com a taxa de aeração pode confirmar uma mudança no metabolismo, como resultado da diferente distribuição e transporte de nutrientes para as células. Os autores ainda verificaram que o aumento lento no pH sugere que a taxa de aeração, capaz de manter o pH por mais tempo em torno do valor inicial, ajuda a superar os efeitos inibitórios em comparação com experimentos sem controle de pH.

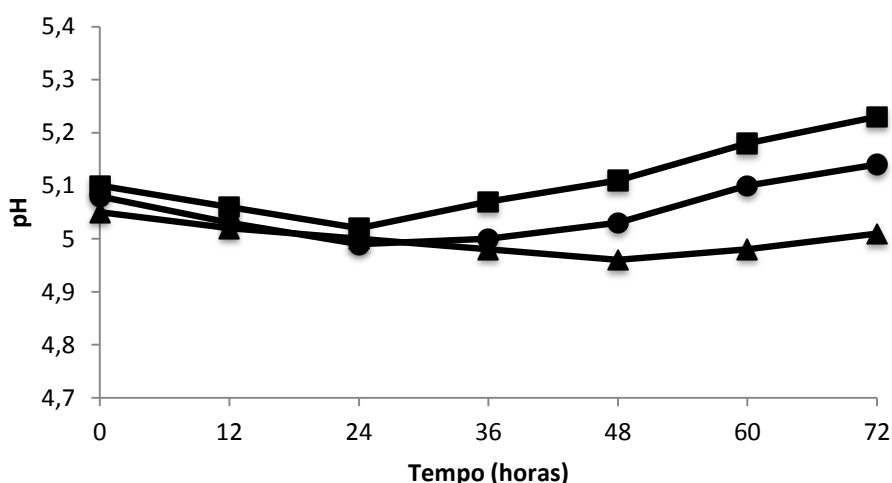


Figura 14 Variação do pH durante o cultivo de *P. stipitis* ATCC 58376 no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol, sob agitação de 100 (▲), 150 (●) e 200 (■) rpm.

5.5.3 Variação de concentração de açúcares e produção de etanol

Nas Figuras 15, 16 e 17, podem ser observados o consumo de glicose, xilose e a produção de etanol nas fermentações com rotação de 100, 150 e 200 rpm. Percebe-se, com os resultados, que o aumento da rotação favoreceu o consumo de glicose, pois com 100 rpm, esse açúcar foi consumido em 48 horas, enquanto com 150 e 200 rpm, o mesmo esgotou-se em 36 e 24 horas, respectivamente. O consumo de xilose também foi afetado pela rotação, pois com 100, 150 e 200 rpm, foram utilizados 93,49; 96,04 e 92,78%, respectivamente, da xilose total que estava presente no meio. Porém, a 100 e 150 rpm, houve consumo de 75 e 72% desse açúcar em 48 horas, respectivamente, com agitação de

200 rpm, cerca de 75% da xilose já haviam sido consumidos nas primeiras 36 primeiras horas.

Com relação à arabinose, foi verificado que manteve-se na concentração próxima a 5 g.L^{-1} (dados não mostrados) durante todos os processos fermentativos avaliados (100, 150 e 200 rpm).

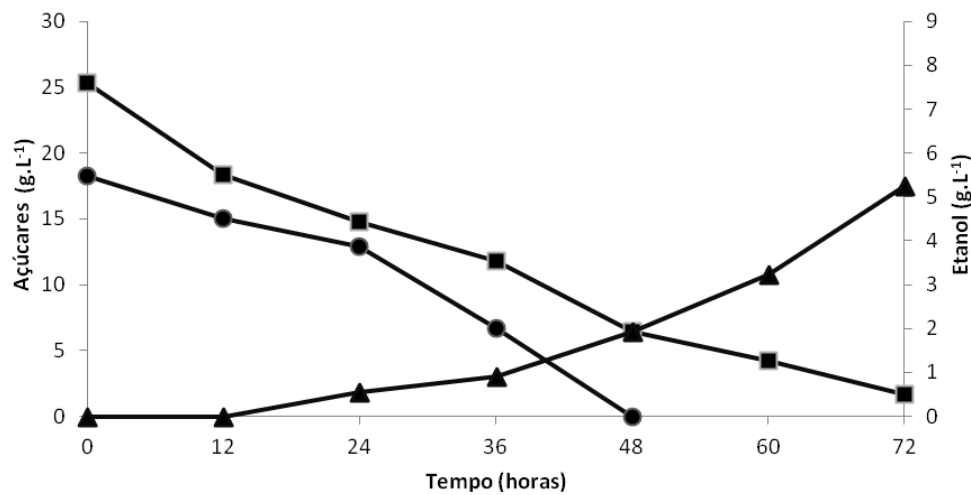


Figura 15 Variação das concentrações de xilose (■) e glicose (●) e produção de etanol (▲) durante o cultivo de *P. stipitis* ATCC 58376 no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol, sob agitação de 100 rpm.

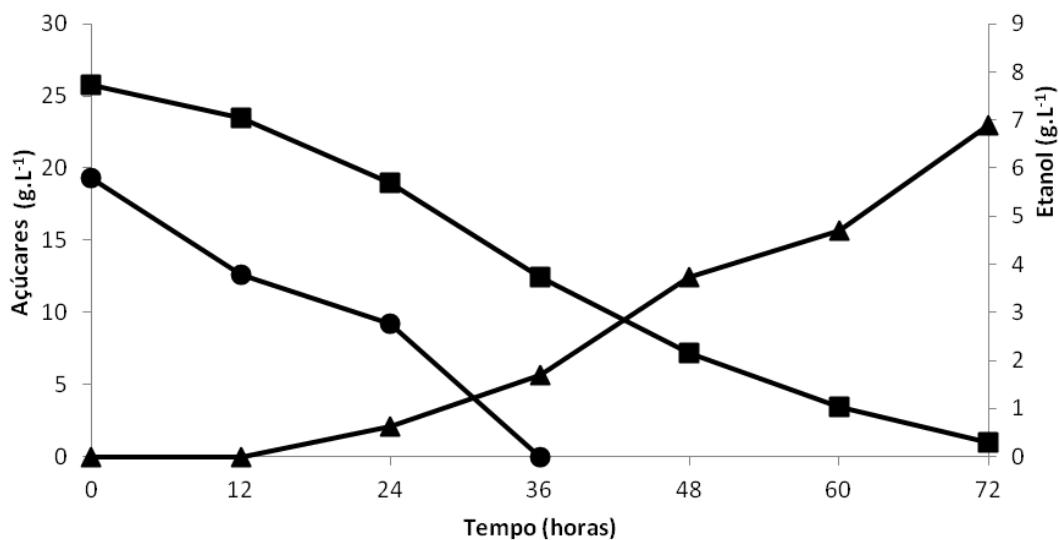


Figura 16 Variação das concentrações de xilose (■) e glicose (●) e produção de etanol (▲) durante o cultivo de *P. stipitis* ATCC 58376 no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol, sob agitação de 150 rpm.

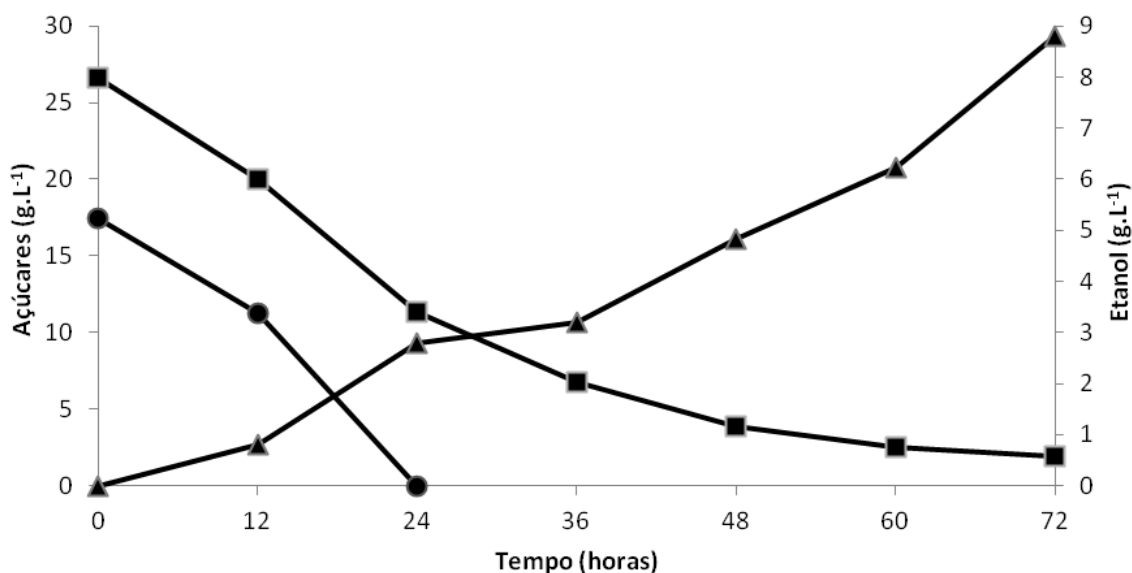


Figura 17 Variação das concentrações de xilose (■) e glicose (●) e produção de etanol (▲) durante o cultivo de *P. stipitis* ATCC 58376 no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol, sob agitação de 200 rpm.

Nas três condições de rotação avaliadas, não foi verificado consumo preferencial da glicose, embora o consumo de ambos açúcares tenha sido mais rápido a 200 rpm, conforme já mencionado.

De acordo com Sánchez et al., (2002), durante o cultivo de *Candida shehatae* (ATCC 34887), *Pachysolen tannophilus* (ATCC 32691) e *P. stipitis* (ATCC 58376) em misturas de glicose e xilose, todas as três leveduras consumiram os açúcares de modo sequencial, iniciando pela glicose. Subsequentemente, a xilose passou a ser consumida, com produção de biomassa e etanol.

Em trabalho realizado por Agbogbo et al., (2006) com diferentes concentrações de glicose e xilose (60 g.L⁻¹ total de açúcares), em meio sintético empregando *P. stipitis* CBS 6054, verificou-se que a glicose foi o substrato preferencial nas misturas entre glicose/xilose. Porém, assim como verificado neste trabalho, o consumo total da glicose foi realizado mais rápido do que para xilose, ou seja, a glicose (60 g.L⁻¹) foi esgotada após 96 h de fermentação, enquanto o consumo de xilose (60 g.L⁻¹) ocorreu após 120 horas de fermentação.

Lee et al. (2000) verificaram que o crescimento de *P. stipitis* NRRL Y-7124 foi superior em meio sintético com 20 g.L⁻¹ de glicose do que em meio com 20 g.L⁻¹ de xilose e, quando ambos açúcares foram misturados, a glicose foi preferencialmente consumida. Todavia, somente após o esgotamento da glicose, a xilose foi utilizada, diferente do observado nos hidrolisados do farelo de girassol.

Observa-se a produção nas três diferentes rotações com relação ao etanol, contudo,

o aumento na concentração de etanol foi favorecido com o aumento da agitação. A maior concentração média ($8,8 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtida com 200 rpm, com um consumo total de 95,64% dos açúcares.

O oxigênio se mostra um fator de importância na regulação da produção de etanol e de outros compostos, visto que está ligado ao potencial redox no interior da célula. Em condições de microaerobiose (200 rpm), há pouco oxigênio e excesso de NADH, levando ao desequilíbrio na taxa NADH/NAD^+ . Tal fato não ocorre com o aumento na taxa de aeração do meio de cultivo. Entretanto, a presença do oxigênio é necessária para o maior crescimento microbiano e para a assimilação da xilose (FURLAN et al., 1991).

Em leveduras, durante a anaerobiose, a cadeia respiratória não produz NAD suficiente para o segundo passo, que é catalisado pela XD, a qual requer NAD. Porém, em *P. stipitis*, como no primeiro passo, a XR tem dupla especificidade, o NAD oxidado no primeiro passo, o qual será utilizado no segundo pela XD (BRUINENBERG et al., 1984). No presente trabalho, isso explica o favorecimento no crescimento e produção de etanol observado com agitação de 200 rpm, pois a *P. stipitis*, embora não precise de oxigênio para fermentação de xilose a etanol, necessita do mesmo para o crescimento e se esse for baixo, pouco etanol será produzido.

De acordo com Nigam (2001), níveis insuficientes de aeração na produção de etanol pela levedura levam a um consumo lento de xilose. Por outro lado, níveis excessivos de aeração reduzem o rendimento devido à oxidação do produto ou ao crescimento celular elevado.

Telli-Okur; Eken-Saraçoglu; (2006), no entanto, verificaram que o aumento da aeração de 2,28 para $7,99 \text{ vv}^{-1}\text{min}^{-1}$ levou a um leve aumento do crescimento de *P. stipitis* NRRL Y-124 no hidrolisado de casca de girassol. Contrariamente, a máxima concentração de etanol ($9,66 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtida com o menor valor de aeração testado, $2,28 \text{ vv}^{-1}\text{min}^{-1}$ e posteriores aumentos de aeração diminuíram a produção de etanol. O fato sugere que há certo limite de aeração acima do qual a produção de etanol diminui.

Soutenburg et al. (2008) obtiveram concentrações de etanol de 7,70; 7,40 e $14,3 \text{ g.L}^{-1}$ a 150, 200 e 250 rpm, respectivamente, durante a fermentação por *P. stipitis* NRRLY-7124 no hidrolisado hemicelulósico proveniente de madeira.

5.5.4 Parâmetros fermentativos da produção de etanol

Na Tabela 11 estão demonstrados os parâmetros fermentativos obtidos durante o cultivo de *P. stipitis* ATCC 58376 no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol com as três diferentes rotações estudadas. A condição de maior agitação proporcionou os maiores valores dos parâmetros avaliados, coincidindo com a condição de favorecimento do crescimento celular e consumo de açúcar. Os valores máximos de rendimento em etanol

($Y_{P/S}$ 0,23 g.g⁻¹), de produtividade em etanol ($Q_P = 0,12$ g.L⁻¹.h) e conversão de xilose e glicose em células ($Y_{X/S} = 0,11$ g.g⁻¹) foram encontrados no ensaio sob rotação de 200 rpm.

Valores superiores de rendimento (0,32 g.g⁻¹) e produtividade (0,32 g.L⁻¹.h) em etanol por *P. stipitis* foram obtidos em biorreator tanque e meio sintético com 90 g.L⁻¹ de xilose, agitação de 250 rpm e aeração de 0,25 vvm (SILVA et al., 2011).

Shupe; Liu (2011) verificaram que os rendimentos em etanol por *P. stipitis* foram afetados pela taxa de agitação do hidrolisado de bordo-açucareiro (planta nativa dos Estados Unidos). O rendimento máximo de 0,39 g.g⁻¹ foi obtido com a taxa de agitação de 150 rpm após 120 horas de fermentação.

Rouhollah et al. (2007) também encontraram valor de 0,08 g.g⁻¹ para $Y_{X/S}$ quando a fermentação com *P. stipitis* CCUG18492 foi conduzida em meio composto por mistura de 30; 30; 12; 8 g.L⁻¹ de glicose, xilose, manose e galactose, respectivamente a 100 rpm.

Tabela 11 Parâmetros fermentativos finais da produção de etanol pela levedura *P. stipitis* ATCC 58376 durante cultivo no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol sob agitação de 100, 150 e 200 rpm

	$Y_{P/S}$ Gli + xil (g.g ⁻¹)	$Y_{X/S}$ Gli+xil (g.g ⁻¹)	Q_P (g.L ⁻¹ .h)
100	0,11	0,03	0,05
150	0,18	0,08	0,09
200	0,23	0,11	0,12

Valores próximos ao hidrolisado do farelo de girassol foram obtidos por Canilha et al., (2010), na produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana com a levedura *P. stipitis* DSM 3651, realizada a 200 rpm, 30 °C por 120 horas e concentração inicial de células de 3 g.L⁻¹. O resultado encontrado pelos autores foi de 4,9 g.L⁻¹ de etanol em 120 h de fermentação. O rendimento foi de 0,20 g.g⁻¹ e a produtividade de 0,04 g.L⁻¹.h quando o hidrolisado não havia passado por destoxificação. Após a desintoxicação por alteração de pH e carvão ativo, foram obtidos 6,1 g.L⁻¹ de etanol em 48 horas, com um rendimento de 0,30 g.g⁻¹ e produtividade de 0,13 g.L⁻¹.h.

5.5.5 Variação da concentração de ácido acético e produção de glicerol, xilitol

Na Figura 18 está demonstrado o comportamento do ácido acético durante a fermentação do hidrolisado de farelo de girassol com 100, 150 e 200 rpm. Verifica-se que, durante as 24 primeiras horas, houve aumento na concentração do ácido acético para as três rotações testadas. No cultivo a 100 rpm, o aumento continuou até as 48 horas, seguido pela redução nas concentrações médias após esse tempo. Porém, para 150 e 200 rpm, a

redução foi observada logo após as 24 horas iniciais. Assim, o aumento na aeração favoreceu o consumo de ácido pela levedura.

Subprodutos, tais como ácidos orgânicos, são produzidos em níveis muito inferiores em processos fermentativos. A formação desses subprodutos bem como o crescimento de células de levedura, inevitavelmente, levam a alguns intermediários glicolíticos para as vias metabólicas correspondentes, mas há diminuição da produção de etanol (BAI; ANDERSON; YOUNG, 2008).

Ao serem relacionados os valores de ácido acético (Figura 18) com o pH (Figura 14), é possível verificar que a redução de pH coincide com o aumento da concentração de ácido acético. No cultivo a 100 rpm, ocorreu redução do pH até as 48 horas, em que também foi verificado o início da redução das concentrações de ácido acético. Quando empregada agitação de 150 e 200 rpm, o aumento do pH foi verificado a partir das 24 horas, que coincidiu com o início do consumo de ácido acético.

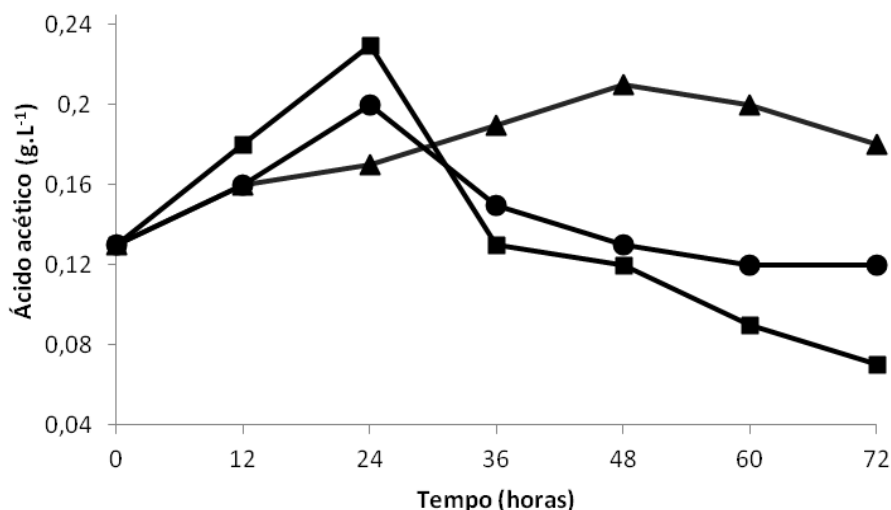


Figura 18 Variação da concentração de ácido acético durante o cultivo de *P. stipitis* ATCC 58376 no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol, sob agitação de 100 (▲), 150 (●) e 200 (■) rpm.

Com relação à formação de glicerol, subproduto do metabolismo de açúcares por *P. stipitis*, durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico do farelo de girassol, verifica-se na Figura 19 a produção do mesmo para as três diferentes rotações durante todo período de fermentação. A concentração foi semelhante durante as primeiras 24 horas, mas, a partir desse tempo, percebe-se que os resultados foram influenciados pela rotação, cuja maior produção (1,15 g.L⁻¹) foi obtida a 200 rpm.

A formação de glicerol, soluto compatível, está normalmente associada à presença de compostos tóxicos presentes no hidrolisado (ARRUDA; FELIPE, 2009) e era esperada no presente trabalho, tendo em vista a presença de fenólicos. A maior produção de glicerol

foi verificada a 200 rpm, condição em que houve maior crescimento celular e maior produção de etanol.

Além do glicerol como subproduto, durante o processo fermentativo do hidrolisado do farelo de girassol também se verificou a formação de xilitol em todas as condições testadas (Figura 20). A 100, 150 e 200 rpm, o xilitol começou a ser produzido a partir das 12 horas, entretanto, o aumento mais relevante ocorreu na menor rotação. A máxima produção de xilitol ($1,48 \text{ g.L}^{-1}$) foi observada com 100 rpm e com 72 horas de fermentação, enquanto que para 200 rpm, que foi a condição onde foi verificada a maior concentração de etanol, foi também verificada uma menor concentração de xilitol, o que demonstra que os açúcares foram convertidos em maior proporção a etanol e uma menor quantidade de carbono foi desviada para a produção de xilitol.

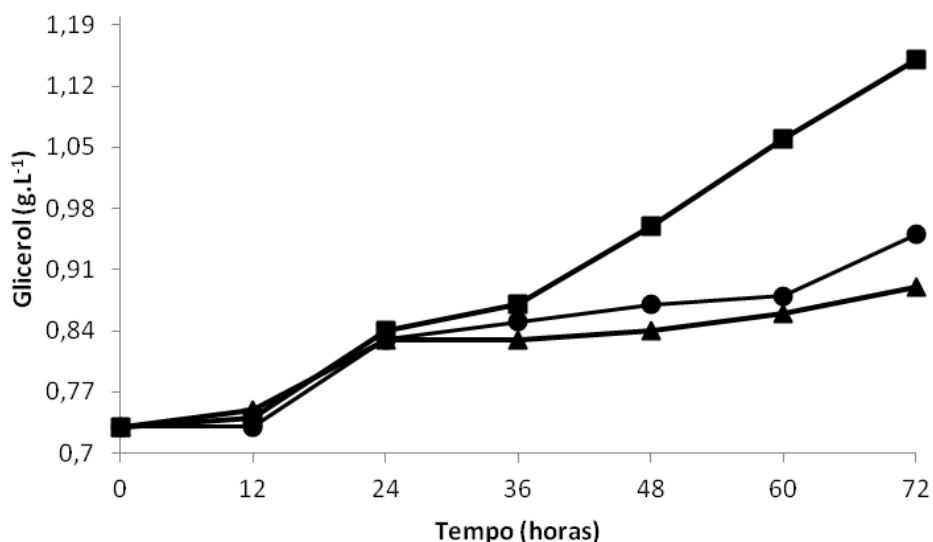


Figura 19 Variação da concentração de glicerol durante o cultivo de *P. stipitis* ATCC 58376 no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol, sob agitação de 100 (▲), 150 (●) e 200 (■) rpm

A formação de xilitol e sua acumulação durante a fermentação são consideradas como uma resposta celular às adversidades do meio, seja pelo desequilíbrio redox que pode ser causado sob restrições de oxigênio, concentração do substrato elevada, ou a presença de inibidores que podem ser gerados durante a fase de pré-tratamento, especialmente se são impostas condições de alta severidade (BETANCUR; PEREIRA-JR, 2010).

Em trabalho realizado para avaliar o efeito do etanol durante o processo fermentativo por *P. stipitis*, foi observado que, na medida em que aumentava a concentração desse produto no meio, aumentava o rendimento em xilitol. Em hipótese, os autores explicam que o rendimento em xilitol é dependente da concentração de etanol e sugere-se que o etanol

pode causar uma perturbação ao equilíbrio NAD/NADH (DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1996).

Há uma íntima relação entre a especificidade da XR, as coenzimas NADH ou NADPH e o acúmulo de xilitol no citoplasma do microrganismo com sua posterior excreção para o meio. Quando a atividade da XR de determinado microrganismo depende de NADH ou NADPH, o cofator NAD utilizado na redução da xilose a xilitol pode ser utilizado no passo metabólico seguinte. Nesse caso, sob tais condições, o principal produto do metabolismo de xilose é o etanol e não há o acúmulo de xilitol. Quando, entretanto, a atividade de XR de um dado microrganismo depende apenas de NADPH, sob condições de limitação de oxigênio, observa-se o acúmulo de xilitol, uma vez que nessas condições a capacidade da cadeia respiratória de recuperação do cofator oxidado é baixa. Isso acarreta diminuição da atividade da XDH e diminuição da taxa de transformação de xilitol à xilulose (BRANCO, 2010).

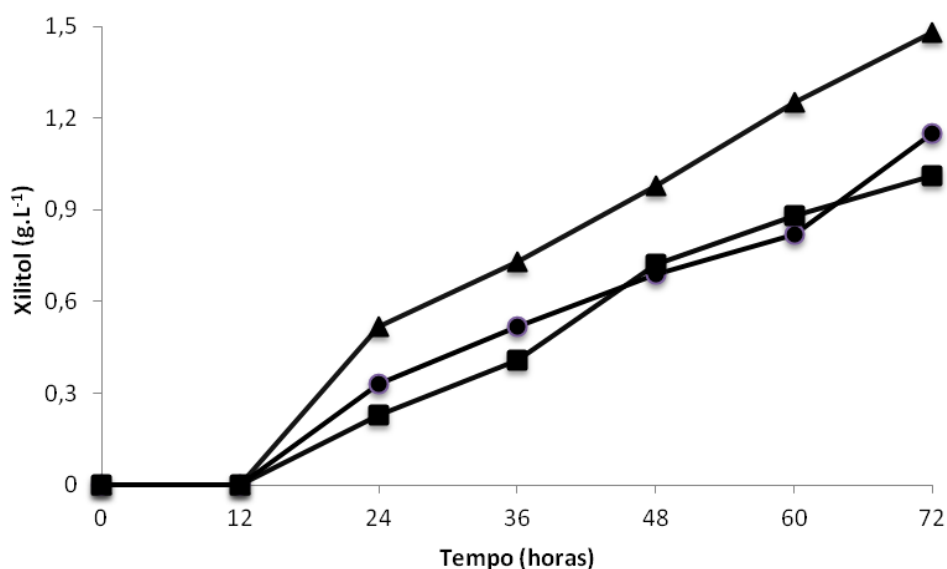


Figura 20 Variação da concentração de xilitol durante o cultivo de *P. stipitis* ATCC 58376 no hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol, sob agitação de 100 (▲), 150 (●) e 200 (■) rpm.

5.6 Sacarificação simultânea à fermentação com *K. marxianus*

5.6.1 Crescimento celular

A hidrólise ácida com 6% de H_2SO_4 por 20 minutos para remoção da fração hemicelulósica resultou na biomassa sólida composta principalmente por celulose e lignina, que, após deslignificação com NaOH, foi utilizada como substrato na sacarificação simultânea à fermentação utilizando a *K. marxianus* ATCC 36907 para a produção de

bioetanol.

Visando à máxima conversão enzimática da celulose em glicose, foram realizados experimentos variando a dosagem da enzima celulase e a proporção de β -glicosidase em relação à celulase, que se procedeu em três níveis de concentração (FPU.g^{-1}) para celulase NS22086 e três subníveis de β -glicosidase NS22118 (CBU.g^{-1}) totalizando 9 experimentos: experimento 1 (10 FPU.g^{-1} de celulase e 6,6 CBU.g^{-1} de β -glicosidase); 2 (10 FPU.g^{-1} de celulase e 5 CBU.g^{-1} de β -glicosidase), 3 (10 FPU.g^{-1} de celulase e 3,3 CBU.g^{-1} de β -glicosidase), 4 (15 FPU.g^{-1} de celulase e 10 CBU.g^{-1} β -glicosidase), 5 (15 FPU.g^{-1} de celulase e 7,5 CBU.g^{-1} β -glicosidase), 6 (15 FPU.g^{-1} de celulase e 5 CBU.g^{-1} β -glicosidase), 7 (20 FPU.g^{-1} de celulase e 13,3 CBU.g^{-1} de β -glicosidase), 8 (20 FPU.g^{-1} de celulase e 10 CBU.g^{-1} de β -glicosidase), 9 (20 FPU.g^{-1} de celulase e 13,3 de β -glicosidase); 10 (20 FPU.g^{-1} de celulase e 6,6 CBU.g^{-1} de β -glicosidase).

O crescimento celular de *K.marxianus* ATCC 36907, nos diferentes experimentos de SSF da biomassa do farelo de girassol, foi avaliado ao final das 72 horas por contagem direta em câmara de Neubauer e os resultados encontrados para esses tempos estão demonstrados na Figura 21.

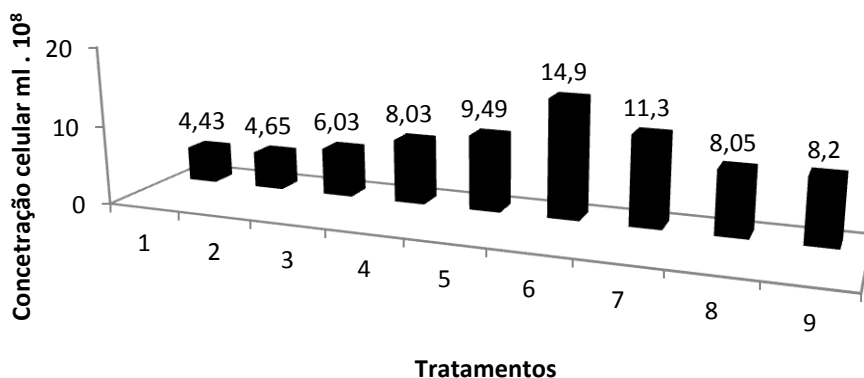


Figura 21 Concentração celular final (72 horas) de *K.marxianus* ATCC 36907 nos experimentos de SSF com biomassa do farelo de girassol com diferentes concentrações de celulase NS22086 (FPU.g^{-1}) e de β -glicosidase NS22118 (CBU.g^{-1}).

Ainda com relação ao crescimento (Figura 21), percebe-se que a quantidade de enzimas empregadas no processo influenciou o aumento do número de células. Os experimentos que utilizaram 15 FPU.g^{-1} de celulase (experimentos 4; 5 e 6) foram os que mais favoreceram o crescimento celular, com média geral de $10,8 \times 10^8/\text{ml}$, seguidos pelo tratamento com 20 FPU.g^{-1} de celulase (experimentos 7; 8 e 9) com média de $9,18 \times 10^8/\text{ml}$ e por último com 10 FPU.g^{-1} de celulase (experimentos 1; 2 e 3) com média de $5,03 \times$

10^8 /ml. A utilização de 15 FPU.g^{-1} de celulase NS22086 e 5 de CBU.g^{-1} β -glicosidase NS22118, no experimento 6, resultou no máximo crescimento celular ($14,9 \times 10^8$ /ml).

Tomás-Pejó et al., (2009) encontraram durante a sacarificação simultânea à fermentação com *K. marxianus* CECT 10875 máximo de $2,2 \times 10^8$; $1,3 \times 10^8$; $0,8 \times 10^8$ e $0,5 \times 10^8 \text{ CFU.mL}^{-1}$ para as concentrações de enzimas Celluclast 5; 15; 25; 35 FPU.g^{-1} , respectivamente.

5.6.2 Variação do pH

Assim como o crescimento celular, o valor de pH nos diferentes experimentos foi avaliado ao final do processo (72 horas) e podem ser conferidos na Figura 22. Considerando que o pH inicial foi ajustado para 5,5 em todos os experimentos, visto que o meio foi tamponado, ao final das 72 horas de fermentação. Verificou-se um ligeiro aumento de pH para todos os experimentos, variações que podem ser decorrentes da adição das diferentes concentrações das enzimas, do inóculo, do substrato e dos próprios produtos e subprodutos formados durante o processo fermentativo. Esse aumento foi mais acentuado (aumento de 0,22) no experimento com 15 FPU.g^{-1} de celulase e 10 CBU.g^{-1} de β -glicosidase (experimento 4).

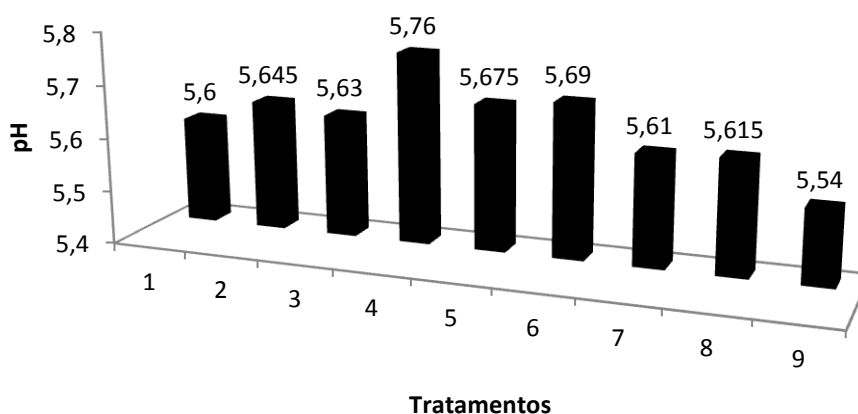


Figura 22 Valores de pH final (72 horas) nos experimentos de SSF com *K. marxianus* ATCC 36907 e biomassa do farelo de girassol com diferentes concentrações de celulase NS22086 (FPU.g^{-1}) e de β -glicosidase NS22118 (CBU.g^{-1}).

5.6.3 Variação da concentração de açúcares e produção de etanol

Na Figura 23, estão demonstrados os perfis de produção e hidrólise da celobiose

durante a SSF com variações na carga enzimática utilizada. Conforme pode ser verificado, de maneira geral, para todas as condições analisadas, ocorreu a formação de celobiose nas primeiras 12 horas. Logo, há indicação de atividade eficiente das enzimas celulases em hidrolisar a celulose, visto que essa faz a conversão de celulose principalmente nesse dissacarídeo. Vale ressaltar que, nesse período, os valores foram próximos entre si e a maior média (11 g.L^{-1}) foi obtida no experimento 4 (15 FPU.g^{-1} de celulase e 10 CBU.g^{-1} β -glicosidase). A partir desse tempo, ocorreu o decréscimo das concentrações de celobiose em todas as condições avaliadas, exceto para os experimentos 6 e 9, cujas concentrações aumentaram e atingiram os valores máximos no tempo correspondente a 24 horas, os quais em seguida decresceram pela ação da B-glicosidase.

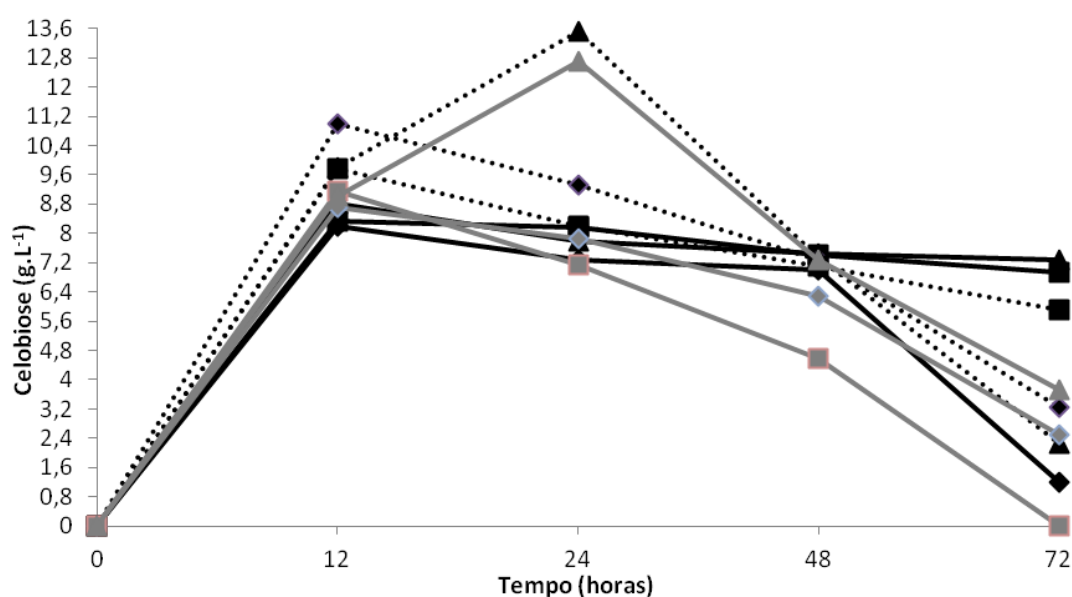


Figura 23 Variação da concentração de celobiose nos experimentos de SSF com *K. marxianus* ATCC 36907 e biomassa do farelo de girassol com diferentes concentrações de celulase NS22086 (FPU.g^{-1}) e de β -glicosidase NS22118 (CBU.g^{-1}), experimento 1 (◆); 2 (■); 3 (▲), 4 (◆), 5 (■), 6 (▲), 7 (◇), 8 (■), 9 (▲)

Kovacs et al., (2009), quando utilizaram *S. cerevisiae* para produção de bioetanol em processo de SSF com bagaço de cana e o complexo enzimático lignocelulítico produzido por *Trichoderma reesei* F-1663, também observaram o acúmulo de celobiose de aproximadamente 10 g.L^{-1} durante as primeiras 10 horas de fermentação e verificaram a necessidade de complementar a carga enzimática com β -glicosidase para reduzir a concentração de celobiose.

No presente trabalho, as maiores concentrações de celobiose ($13,52$ e $12,7 \text{ g.L}^{-1}$) foram obtidas no experimento 6 (15 FPU.g^{-1} de celulase e 5 CBU.g^{-1} β -glicosidase), seguidas pelo experimento 9 (20 FPU.g^{-1} de celulase e $13,3$; 10 e $6,6 \text{ CBU.g}^{-1}$ de β -

glicosidase), ambos com 24 horas de sacarificação. Esses resultados estão relacionados com as diferentes concentrações de β -glicosidase, adicionadas nos experimentos e indicam que as menores concentrações de β -glicosidase não foram suficientes para hidrolisar a celobiose no mesmo ritmo de seu aparecimento no meio.

Ao final das 72 horas do processo de SSF, cerca de 83; 82 e 60% do conteúdo total de celobiose formado ainda estavam presentes no meio nos experimentos 3 (10 FPU.g⁻¹ de celulase e 3,3 CBU.g⁻¹ de β -glicosidase); 2 (10 FPU.g⁻¹ de celulase e 5 CBU.g⁻¹ de β -glicosidase) e 5 (15 FPU.g⁻¹ de celulase e 7,5 CBU.g⁻¹ de β -glicosidase), respectivamente. Esses resultados indicam que a taxa de hidrólise da celobiose se manteve estável durante todo o processo (72 horas) ou então que a atividade da β -glicosidase não foi suficiente para realizar a conversão em glicose, todavia, para o experimento 8, a celobiose foi totalmente hidrolisada.

A produção de glicose durante a SSF com a concentração de 10, 15 e 20 FPU.g⁻¹ de celulase e 1/3; 1,5/3 e 2/3 de β -glicosidase (experimentos 1 a 9) está demonstrada na Figura 24. Observa-se no gráfico que os experimentos 1, 3, 4, 5, 6 e 7 apresentaram perfis parecidos, com a maior produção em 12 horas, seguidos da redução gradativa até consumo total.

A máxima concentração de glicose (32,3 g.L⁻¹) foi observada no experimento 6 (15 FPU.g⁻¹ de celulase e 5 CBU.g⁻¹ de β -glicosidase). Nessa condição também foi evidenciado o maior crescimento celular ao final do processo, o que indica que a quantidade superior dessa hexose prontamente disponível foi utilizada como substrato pelo microrganismo, aumentando assim a biomassa. O maior acúmulo de celobiose também foi observado no experimento 6, em 24 horas (Figura 23), ou seja, a maior concentração de glicose formada nesta condição está relacionada à maior formação de celobiose e taxa de hidrólise da mesma.

Concentrações elevadas de glicose (30,5 e 28,43 g.L⁻¹) durante as primeiras 12 horas, seguidas pelo esgotamento total deste açúcar também foram observadas nos experimentos 7 (20 FPU.g⁻¹ de celulase e 13,3 CBU.g⁻¹ de β -glicosidase) e 5 (15 FPU.g⁻¹ de celulase e 7,5 CBU.g⁻¹ β -glicosidase). Essas maiores concentrações em menor tempo são decorrentes da relação adequada entre as enzimas, pois uma maior quantidade de celulase adicionada no processo promoveu a rápida hidrólise da celulose em celobiose e somada à ação da quantidade adequada de β -glicosidase que converteu a celobiose em glicose. Vale ressaltar que é importante que ocorra a rápida conversão de celobiose em glicose e o acelerado consumo da glicose, pois o acúmulo de celobiose no meio inibe a ação da celulase, entretanto, a alta concentração de glicose no meio inibe a atividade da β -glicosidase.

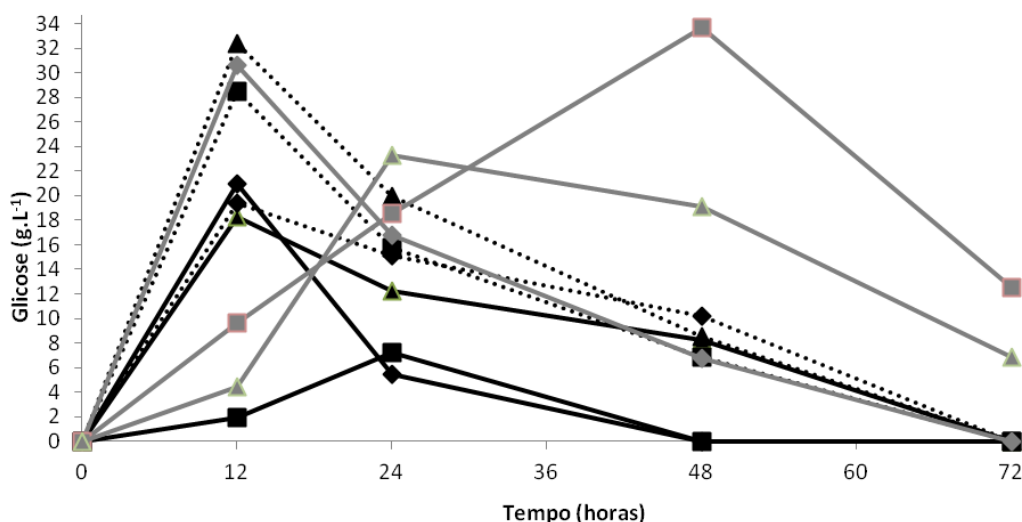


Figura 24 Variação da concentração de glicose nos experimentos de SSF com *K. marxianus* ATCC 36907 e biomassa do farelo de girassol com diferentes concentrações de celulase NS22086 (FPU.g⁻¹) e de β -glicosidase NS22118 (CBU.g⁻¹), experimento 1 (—◆—); 2 (—■—); 3 (—▲—), 4 (··◆··), 5 (··■··), 6 (··▲··), 7 (—○—), 8 (—■—), 9 (—▲—)

No experimento 8 verificou-se que a concentração média de glicose aumentou conforme o passar do tempo, sendo que o maior valor (30,64 g.L⁻¹) foi obtido com 48 horas, valor que a partir desse tempo decaiu; ao final das 72 horas ainda restaram 37,28% para serem consumidos. Já no experimento 9, a maior concentração de glicose (23,26 g.L⁻¹) foi verificada em 24 horas, seguida pelo decréscimo em 18,82% em 48 horas e 70% em 72 horas. Segundo Ballesteros et al., (2004), a presença de glicose no último estágio da sacarificação simultânea à fermentação, como observado para este experimento, indica que a celulase continua em atividade.

Os diferentes perfis verificados para a glicose podem estar relacionados com as diferentes concentrações utilizadas da β -glicosidase. O maior valor dessa enzima resultou na conversão de celobiose em glicose em menor tempo. Quando utilizada a menor carga de β -glicosidase, a conversão foi mais lenta e ao fim das 72 horas ainda havia glicose disponível.

Segundo Luo; Liu (2010), a taxa de sacarificação da celulose aumenta com o aumento concentração das enzimas. Além disso, a β -glicosidase é um complemento à reação de hidrólise da celobiose que quando se acumula exerce efeito inibitório sobre a atividade de enzimas celulasas. Como resultado à adição de β -glicosidase, os efeitos inibitórios do acúmulo de açúcar são evitados ao mesmo tempo que são utilizados para a fermentação e, como consequência, a rápida produção de glicose e fermentação leva a um aumento na concentração de etanol e no rendimento.

Na Figura 25 está demonstrada a produção de etanol durante o processo SSF com

K. marxianus ATCC 36907 e biomassa do farelo de girassol com diferentes concentrações de celulase NS22086 (FPU.g^{-1}) e de β -glicosidase NS22118 (CBU.g^{-1}). Observa-se que, em todos os casos, houve a formação de etanol a partir da conversão enzimática da celulose em açúcares fermentáveis e a metabolização desses pela levedura.

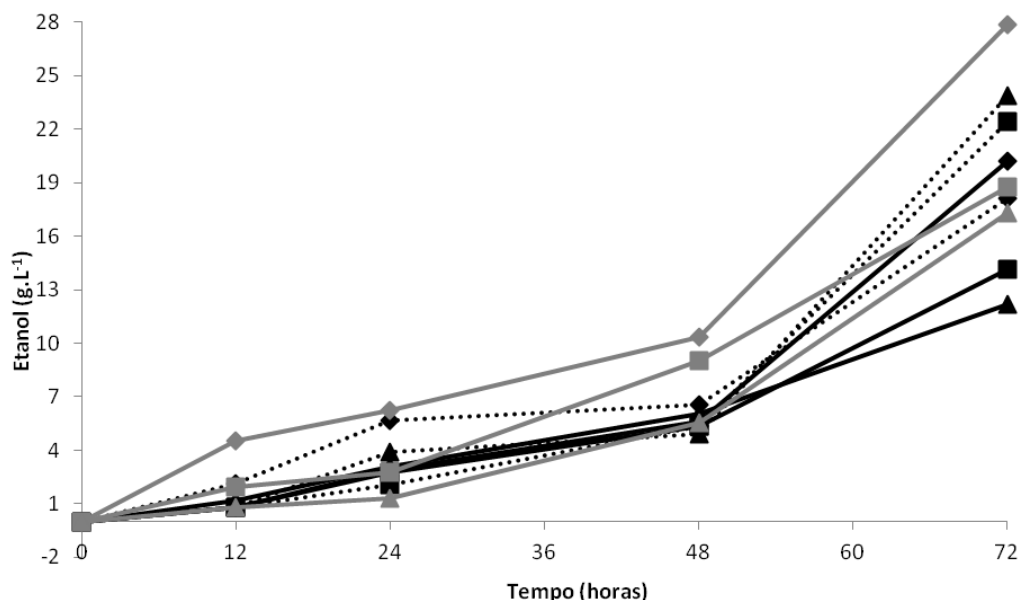


Figura 25 Variação da concentração de etanol nos experimentos de SSF com *K. marxianus* ATCC 36907 e biomassa do farelo de girassol com diferentes concentrações de celulase NS22086 (FPU.g^{-1}) e de β -glicosidase NS22118 (CBU.g^{-1}), experimento 1 (◆); 2 (■); 3 (▲), 4 (◆), 5 (■), 6 (▲), 7 (◆), 8 (■), 9 (▲).

Ao observar a Figura 25, percebe-se que a maior concentração produzida de etanol foi verificada no experimento 7 (20 FPU.g^{-1} de celulase e $13,3 \text{ CBU.g}^{-1}$ de β -glicosidase). É possível considerar com esse resultado que a maior concentração de β -glicosidase promoveu uma maior degradação dos β -glicosídeos em açúcares que foram utilizados pela levedura para crescimento e produção de etanol.

É possível considerar que, embora a maior concentração de glicose tenha sido encontrada no experimento 6, a maior produção de etanol não foi verificada no mesmo. Provavelmente, essa resposta ocorreu pelo fato da glicose ter sido direcionada ao aumento de biomassa, visto que neste tratamento foi verificado o maior crescimento celular.

Vale considerar que no experimento 8 (Figura 24), foi obtida a mais alta concentração de glicose com a sacarificação e que, ao final do período avaliado, a concentração residual de glicose no meio ainda era de $3,73 \text{ g.L}^{-1}$. Todavia, se o tempo de fermentação fosse estendido, provavelmente a concentração final de etanol seria maior.

Menores concentrações de etanol (16 a 19 g.L^{-1}) foram obtidas com *K. marxianus* CECT 10875 em experimento de SSF a $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando 15 FPU.g^{-1} de celulase comercial

Celluclast e biomassa de álamo, eucalipto, palha de trigo, bagaço de sorgo e *B. carinata*. O pré-tratamento, diferentemente do realizado neste trabalho, foi realizado com explosão a vapor e apresentou em média 56 g.L^{-1} de glicose na biomassa após o pré-tratamento (BALLESTEROS et al., 2004).

Luo; Liu (2010), ao aplicarem uma maior concentração de enzima (30 FPU.g^{-1} de Celluclast/ β -glucosidase Novozyme 188) na sacarificação da palha de trigo (pré-tratada com ácido sulfúrico diluído $1\% \text{ m.v}^{-1}$, $190 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por 60 minutos), obtiveram concentrações médias de etanol ($23,1 \text{ g.L}^{-1}$) próximas às encontradas no presente trabalho no experimento 6 e inferiores às encontradas no experimento 7.

Concentrações de etanol ($26,3 \text{ g.L}^{-1}$) próximas às obtidas neste experimento foram encontradas em experimento que empregou resíduos da poda de oliveiras pré-tratadas com $1\% \text{ (v.v}^{-1})$ de H_2SO_4 , $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min e submetidos à SSF com *S. cerevisiae* utilizando 9% de sólido, 15 FPU.g^{-1} de celulase e 15 UI de β -glicosidase com $4\% \text{ (v.v}^{-1})$ de inóculo, conduzidos a $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 h e 150 rpm (MANZANARES et al., 2011).

Tomás-Pejó et al., (2009), ao estudarem o efeito das concentrações (5 e 35 FPU.g^{-1}) de celulases Celluclast LFG, com $10\% \text{ m.v}^{-1}$ de substrato sobre o crescimento e a produção de etanol por *K. marxianus* CECT 10875 em SSF, a $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por 72 h, a 150 rpm, $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de inóculo, verificaram a maior produção de etanol ao utilizarem 15 FPU.g^{-1} .

5.6.4 Parâmetros fermentativos da produção de etanol

Na Tabela 12 estão demonstrados os parâmetros fermentativos finais obtidos nos experimentos de sacarificação simultânea à fermentação de *K. marxianus* ATCC 36907. Neste caso, foi empregada a fração celulósica do farelo de girassol com variações na concentração de celulase NS22086 e β -glicosidase NS22118. O rendimento denominado de ($Y_{E/G}$) foi calculado em função da maior concentração de glicose obtida durante a SSF, porém, vale ressaltar, que os rendimentos podem ser superiores a 0,51 (a partir da estequiometria), pois como a hidrólise acontece ao mesmo tempo em que ocorre o consumo do açúcar, não é possível ter o valor real da glicose produzida, já que a glicose continua a aparecer no meio enquanto a levedura a utiliza para crescer e/ou fermentar.

Já os cálculos de rendimento utilizados em processos de SSF foram realizados a partir dos rendimentos da concentração inicial de celulose na biomassa encontrada durante a caracterização, que no caso do farelo de girassol tratado e designificado foi de $77,3 \text{ g.L}^{-1}$. A partir do rendimento da celulose estimou-se a concentração máxima teórica de etanol se toda a celulose presente na fibra tivesse sido convertida em etanol, valor esse de $39,63 \text{ g.L}^{-1}$, a partir do qual estimou-se o máximo teórico em etanol (%) obtido em cada experimento.

O melhor rendimento ($0,35 \text{ g.g}^{-1}$) de etanol a partir da celulose foi obtido com o experimento 7 (20 FPU.g^{-1} de celulase e $13,3 \text{ CBU.g}^{-1}$ de β -glicosidase). O mesmo

experimento apresentou a melhor conversão enzimática (21,95%) e a melhor produtividade volumétrica de etanol (0,38 g.L⁻¹.h), demonstrando que essa é a melhor proporção entre as enzimas empregadas no processo de SSF com *K.marxianus* em meio formado com a biomassa do farelo de girassol pré-tratado, H₂SO₄ e deslignificado com NaOH.

Tabela 12 Parâmetros fermentativos finais da produção de etanol nos experimentos de SSF com *K.marxianus* ATCC 36907 e biomassa do farelo de girassol com 10; 15 e 20 FPU.g⁻¹ de celulase NS 22086 e 1/3; 1,5/3 e 2/3 de β -glicosidase NS22118

Y _{E/C} (g.g ⁻¹)	Y _{E/G} (g.g ⁻¹)	Etanol máximo teórico (%)	ECC (%)
0,26	0,96	25,99	19,28
0,18	0,86	18,15	3,56
0,15	0,66	15,63	2,92
0,23	0,9	23,28	10,92
0,28	0,78	28,8	7,44
0,30	0,73	30,75	20,82
0,35	0,91	35,87	21,95
0,24	0,55	24,16	2,93
0,22	0,74	22,28	3,20

De maneira geral, o aumento na concentração de celulase e β-glicosidase na SSF resultou no aumento da taxa de produção e conseqüentemente no maior rendimento de etanol nos experimentos testados. Além disso, ficou evidente que concentrações menores das enzimas promoveram as menores taxas de sacarificação, logo, as concentrações mais baixas de glicose disponível para o metabolismo celular resultaram em menores valores de produtividade, rendimento e concentração de etanol.

Considerando que o custo das enzimas para a hidrólise em um processo de sacarificação simultânea à fermentação é um dos fatores que mais tornam oneroso o processo, ressalta-se a importância de estudos sobre o efeito da celulase nas diferentes biomassas a fim de que sejam encontradas concentrações de enzimas que promovam a máxima conversão enzimática da celulose em glicose e com menores dosagens enzimáticas, de forma que esse processo seja mais econômico. Nesse sentido, bons resultados foram encontrados com experimento 6 (15 FPU.g⁻¹ de celulase e 5 CBU.g⁻¹ β-glicosidase), no qual foram obtidos maior crescimento celular, maior rendimento, maior produtividade e elevada concentração de etanol. O aumento das doses de celulases, até certo ponto, pode aumentar os rendimentos de hidrólise e de etanol, porém, somente até certo nível de saturação (STENBERG et al., 2000).

Bannat; Nigam; Marchant (1992) obtiveram 98% do rendimento teórico de etanol e $1.71 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}$ de produtividade em 140 g.L^{-1} de glicose por *K. marxianus* IMB2 a 45°C . Enquanto os valores de 35%, 49%, 63% e 67% do máximo teórico de etanol foram obtidos respectivamente com 3, 6, 12 e 14 FPU. g^{-1} enzimas Celluclast durante a sacarificação simultânea a fermentação com *S. cerevisiae*, a partir do hidrolisado da palha de trigo, pré-tratada com 0,2% de H_2SO_4 , com 5% de sólidos, 190°C por 10 minutos (LINDE et al., 2007). Valores superiores (78,3% com base no máximo teórico) foram obtidos durante a SSF com 60 FPU de celulase comercial (Accellerase 1000) por grama de glicose utilizando 10 mL de inóculo de *S. cerevisiae* D5A a 38°C e 170 rpm com os resíduos do tronco de palma (JUNG et al., 2011).

5.6.5 Formação de subprodutos

Além da produção de etanol também foi analisada a produção de glicerol por *K. marxianus* durante os tempos de 12, 24, 48 e 72 horas e de xilitol ao final das 72 horas, os resultados estão demonstrados na Tabela 13. Ao final do período, a maior concentração de glicerol ($2,62 \text{ g.L}^{-1}$) foi verificada no experimento 8 (20 FPU.g^{-1} de celulase e 10 CBU.g^{-1} de β -glicosidase).

Segundo Bai; Anderson; Young, (2008), além de etanol e CO_2 , vários subprodutos também são produzidos durante a fermentação alcoólica, cujo principal é o glicerol (cerca de 1,0% m.v⁻¹). Condições como maior pH e aumento da pressão osmótica geram menor fluxo de piruvato devido à utilização de intermediários glicolíticos. Assim, a produção de NAD diminui e é possível que ocorra a conversão de dihidroxiacetona fosfato em glicerol (INGLEDEW; 1999). Por outro lado, os produtos secundários formados durante a fermentação são rapidamente consumidos pela *K. marxianus* assim que a fonte de carbono principal termina (FONSECA et al., 2007).

O glicerol é um produto secundário da fermentação e está acoplado à manutenção do equilíbrio oxi-redutor da célula que é alterado pela presença de ácidos orgânicos, estresse osmótico e excesso de biomassa (SAITO; CABELLO, 2006). Arruda e Felipe (2009) verificaram que o glicerol é um subproduto originado como mecanismo de defesa da levedura *C. guilliermondii* durante a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana, em que o xilitol é o principal produto do metabolismo de xilose.

Com relação ao xilitol, este somente foi detectado ao final das 72 horas sendo o experimento 8 foi o que apresentou a maior concentração ($0,46 \text{ g.L}^{-1}$).

A presença de xilitol se deve ao fato de que as enzimas necessárias para a fermentação de xilose, xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD) devem ser ativadas pela presença de xilose (MUELLER; WILKINS, BANAT, 2011). No presente trabalho a xilose estava em concentrações baixas, visto que a biomassa havia sido inicialmente pré-

tratada com 6% de H_2SO_4 resultando na biomassa com maior percentual de celulose e com pouca xilose residual.

Tabela 13 Variação da concentração de glicerol girassol para os tempos de 12, 24, 48 e 72 horas e concentração do xilitol em 72 horas nos experimentos de SSF com *K. marxianus* ATCC 36907 e biomassa do farelo de girassol

Experimentos/tem po (horas)	Glicerol (g.L ⁻¹)				Xilitol (g.L ⁻¹)
	12	24	48	72	72
1	0,72	0,82	1,03	1,22	0,12
2	0,82	0,90	1,01	1,15	N.D.
3	0,87	0,90	0,95	0,96	N.D.
4	0,83	0,90	0,94	0,98	0,21
5	0,84	0,88	0,92	0,96	0,13
6	0,92	1,02	1,07	1,14	N.D.
7	0,96	1,01	1,05	1,12	0,14
8	0,81	1,06	1,16	2,62	0,46
9	0,86	1,01	1,06	1,11	0,11

6 CONCLUSÕES

- A partir da caracterização química da torta e do farelo de girassol foi possível verificar que ambos materiais podem ser utilizados em bioprocessos, tendo em vista o conteúdo de celulose e hemicelulose;
- O aumento na concentração de ácido sulfúrico e no tempo de hidrólise proporcionou o aumento das concentrações de açúcares monoméricos, porém resultou em um aumento significativo dos compostos inibitórios;
- A melhor condição de hidrólise do farelo de girassol para obtenção do hidrolisado hemicelulósico foi com 6% de ácido sulfúrico e 20 minutos. Com essa mesma condição, a fração sólida restante apresentou alto conteúdo celulósico;
- A caracterização da fração sólida restante demonstrou que o pré-tratamento do farelo com 6% de ácido sulfúrico e 20 minutos removeu a hemicelulose de maneira eficiente, enquanto o processo de deslignificação removeu boa porcentagem da lignina;
- O hidrolisado hemicelulósico demonstrou a vantagem de não necessitar de um processo subsequente para concentração de açúcares
- O hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol apresentou-se adequado para a produção de bioetanol por *P. stipitis* e resultou em melhores rendimentos de etanol quando o processo foi agitado a 200 rpm;
- A porção celulósica foi submetida à sacarificação simultânea à fermentação com *K. marxianus* e a maior produção de etanol foi obtida na condição de 20 FPU.g⁻¹ de celulase e 15 CBU.g⁻¹ de β-glicosidase.
- Os rendimentos de etanol obtidos tanto a partir da xilose quanto da celulose estão próximos aos encontrados na literatura

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora os objetivos do trabalho tenham sido alcançados e bons resultados tenham sido obtidos, cabe ressaltar que novas propostas de trabalho devem ser realizadas a fim de que sejam melhorados os rendimentos. Entre esses, pode-se citar a realização da quantificação de metais tanto na torta e farelo, como no hidrolisado, como proposta para implementação de um processo de destoxificação mais adequado.

Além disso, o estudo (ok) a partir de fatores que interferem no metabolismo dos microrganismos tais como pH, temperatura, concentração do substrato, sensibilidade da levedura ao produto formado, concentração de oxigênio, entre outros, devem ser estudados deve continuar para maior entendimento de sua interferência no processo fermentativo e melhoria dos resultados.

8 REFERÊNCIAS

- ADLER, E. Lignin chemistry- past, present and future. **Wood Science and Technology**, New York, v. 11, p. 169-218, 1977.
- AGBOGBO, F. A.; COWARD-KELLY, G.; TORRY-SMITH, M.; WENGER, K. S. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, London, v. 41, p. 2333–2336, 2006.
- AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Journal Biotechnology Letters**, Dordrecht v. 30, n. 9, p. 1515-1524, 2008.
- AGUIAR, R. H; FANTINATTI, J. B.; GROTH, D.; USBERTI, R. Qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de girassol de diferentes tamanhos. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 134-139, 2001.
- AKPINAR, O.; LEVENT, O.; SABANCI, S.; UYSAL, R. S.; SAPCI, B. Optimization and comparison of dilute acid pretreatment of selected agricultural residues for recovery of xylose. **Bioresources**, Iowa, v. 6, n. 6, p. 40103–4016, 2011.
- ALBUQUERQUE, M. C. G.; MACHADO, Y. L.; TORRES, A. E. B.; AZEVEDO, D. C. S.; CAVALCANTE JR., C. L.; FIRMIANO, L. R.; PARENTE JR., E. J. S.; Properties of biodiesel oils formulated using different biomass sources and their blends. **Renewable Energy**, Oxford, v. 34, n 3, p. 857-859, 2009.
- ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guillieromondii*. **Current Microbiology**, New York, v. 58, P. 274-278, 2009.
- ASLI, A. E.; QATIBI, A. Ethanol production from olive cake biomass substrate. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, New York, v. 14, n. 1; p 118-122, 2009.
- BACKES, R. L.; SOUZA, A. M.; BALBINOT, J. A. A.; GALLOTTI, G. J. M.; BAVARESCO, A. Desempenho de cultivares de girassol em duas épocas de plantio de safrinha no planalto norte catarinense. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 41-48, 2008.
- BAI, F.W; ANDERSON, W. A.; YOUNG, M. M.; Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 1, p. 89–105, 2008.
- BALALIC, I. M.; CRNOBARAC, J. Z.; MIKLIC, V. J. Interaction hybrid x planting date for oil yield in sunflower. **Journal of Agricultural Sciences**, Toronto, v. 55, n. 1, p. 9-16, 2010.
- BALAN, V.; ROGERS, C.A.; CHUNDAWAT, S.P.S.; SOUSA, L. C.; SLININGER, P.J.; GUPTA, R.; DALE, B.E. Conversion of extracted oil cake fibers into bioethanol including canola, sunflower, sesame, soy, and peanut for integrated biodiesel processing. **Journal of the American Oil Chemists Society**. Champaign, v. 86, p. 157-165, 2009.
- BALLESTEROS, M; OLIVA, J.M., NEGRO, M.J., MANZANARES, P., BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, New York, v. 39, n. 12, p. 1843-1848, 2004.
- BANNAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, P. Isolament de thermotolerant fermentative yeasts capable of growth at 52 °C and ethanol production at 45°C and 50°C. **Journal**

Microbiology and Biotechnology, Berlim, v. 8, p. 259–263, 1992.

BELLIDO, C.; BOLADO, S.; COCA, M.; LUCAS, S.; GONZÁLES-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, New York, v. 102, n. 23, p. 10868-10874, 2011.

BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA-JR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production, Part II: Hemicellulose hydrolysate fermentability. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 13, n 5, 2010.

BETTIGA, M.; BENGTSSON, O.; HAHN-HA, G. B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Arabinose and xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a fungal pentose utilization pathway. **Microbial Cell Factories**, Londres, v. 8, n. 40, p. 2-12, 2009.

BORSUK, L. J. **Cultivo de girassol sob a perspectiva da agroenergia: uma análise dos produtores familiares assentados de Abelardo Luz – SC**. 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

BRANCO, R. F. **Produção enzimática de xilitol utilizando sistema de regeneração de coenzima como alternativa as vias química e microbiológica de obtenção**. 2010. 132 f. Tese (Doutor) - Curso de Biotecnologia Industrial, Departamento de Microbiologia Aplicada, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C.; OLIVEIRA-JR, R. S.; SCAPIM, C. A.; VOLL, E.; GAZZIERO, D. L. P. Períodos de interferência de plantas daninhas na cultura do girassol. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 2, p. 251-257, jun. 2004.

BRUINENBERG, P. M.; BOT, P. H. M.; DIJKEN, J. P. V.; SCHEFFERS, W. A. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 19, p. 256-260, 1984.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Porto Alegre: 3 ed., Artmed Editora, 2000. 751 p.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 161, n. 1-8, p. 84-92, 2010.

CARVALHO, W.; SANTOS, J. C.; CANILHA, L.; SILVA, S. S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate metabolic behaviour of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca-alginate. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam v. 25, p. 25-31, 2005.

CASTRO, A. M. de; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.1, p. 181-188, 2010.

CHANDEL, A.; CHANDRASEKHAR, G; RADHIKA, K.; RAVINDER, R.; RAVIDRA, P. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, Victoria Island v. 6, n. 1, p. 008-020, 2011.

CHANDEL. A. K.; KAPOOR, R. K.; SINGH, A.; KUHAD, R. C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, New York, v. 98, p 1947–1950, 2007.

CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. **Critical Reviews in Biotechnology**, Cleveland, v. 18, n. 4, p. 295-331, 1998.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, Nova Gales do Sul, v. 5, p. 578-595, 2009.

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

DU PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B.A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, New York. v. 8, p. 360-36, 1986.

DU PREEZ, J. C.; PRIOR, B. A. A quantitative screening of some xylose-fermenting yeast isolates. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 7, p, 241-246, 1985.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulosic to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, New York, v. 55, n 1, p. 1-37, 1996.

FERREIRA, M. de A.; SILVA, F. M.; BISPO, S. V.; AZEVEDO, M. Strategies for the supplementation of dairy cows in the Brazilian semi-arid. **Revista Brasileira Zootecnia, Viçosa**, v. 38, p. 912-920, Jul. 2009.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. da; SILVA, F. de C. da. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p.623-638, 2009.

FONSECA, B. G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis***. 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade São Paulo, Lorena, 2009.

FONSECA, G. G.; GOMBERT, A. K.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C. Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. **FEMS Yeast**, Amsterdam, v. 7, p. 422-435, 2007.

FURLAN, A. C.; MANTOVANI, C.; MURAKAMI, A. E. Utilização do farelo de girassol na alimentação de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 1, p. 158-164, 2001.

FURLAN, S. A., BOUILLOUD, P.; STREHAIANO, P.; RIBA, J. P. Study of xylitol formation under oxygen limited conditions. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 13, p. 203–206, 1991.

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

GOSHADROU, A.; KARIMI K.; TAHERZADEH, M. J. Bioethanol production from sweet shorghum bagasse by *Mucor hiemalis*. **Industrial Crops and Products**, London, v. 34, n. 1, p 1219-1225, 2011.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T., SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação

de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, jul. 2009.

GROMPONE, M. A. **Sunflower oil**. In: SHAHIDI, F. Bailey's industrial oil & fat products. 6.ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2005. v.2.

GURGEL, L. V. A. **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar: estudo cinético de sacarificação de celulose para produção de etanol**. 2010. 315 f. Tese (Doutor) - Curso de Ciências, Departamento de Físico-química, Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

HAN, R.; ZHANG, L.; SONG, C.; ZHANG, M.; ZHU, H.; ZHANG, L. Characterization of modified wheat straw, kinetic and equilibrium study about copper ion and methylene blue adsorption in batch mode. **Carbohydrate Polymers**, New York, v. 79, n. 4, p. 1140-1149, 2010.

HERRERA, S.; TÉLLEZ-LUIS, S. J.; RAMIREZA, J. A.; VÁZQUEZB, M. Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid. **Journal of Cereal Science**. London, v. 37, n. 3, p. 267-274, 2004.

INGLEDEW, W. M. **Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer**; In: The alcohol textbook. 3 ed. UK: Nottingham, University Press, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível <www.ibge.gov.br>. Acesso em: Novembro de 2011.

JARGALSAIKHAN, O.; SARACOGLU, N. Application of experimental design method for ethanol roduction by fermentation of sunflower seed hull hydrolysate using *Pichia stipitis* NRRL-124. **Chemical Engineering Communications**, Filadélfia, v. 196, p. 93-103, 2009.

JEFFRIES, T. M; VLEET, J. R. H. V. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. **Journal Federation of European Microbiological Societies**, Amsterdam, n. 9, v.6, p. 793-807, 2009.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, p. 25-40, 2007.

JUNG, Y. H.; KIM, J; KIM, J. J.; OH, K. K.; HAN, J; CHOI, I. G.; KIM, K. H. Ethanol production from ail palm trunks treated with aqueous ammonia and cellulose. **Bioresource Technology**, New York, v. 102, n. 15, p. 7307 -7312, 2011.

KADAR, Z. S., SZENGYEL, Z. S., RECZEY, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Industrial Crops Products**, v. 20, n. 1, p. 103-110, jul. 2004.

KOVACS, K. MACRELLI, S.; SZAKACS, G.; ZACCHI, G. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. **Biotechnology Biofuels**, Londres v. 12, p. 2-14, 2009.

KUMAR, R; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlim, v. 35, n. 5, p. 377-391, mai. 2008.

KUMAR, S.; SINGH, P. S.; MISHRA, I. M.; DILIP, A. D. Feasibility of ethanol production with enhanced sugar concentration in bagasse hydrolysate at high temperature using *Kluyveromyces* sp. IPE453. **Future Science**, Londres, v. 1., n. 5, p. 697-704, set. 2010.

- KUMAR, S.; SINGH, S. P.; MISHRA, I. M.; ADHIKARI, D. K. Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp IIPE453. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. Berlín, v. 36, n.12, p. 1483-1489, 2009.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 56, p.1-24, 1997.
- LEE, T.; KIM, M.; KIM, K.; P, K.; RYU, Y.; SEO, J. Parametric study on ethanol production from xylose by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, New York, v. 5, p. 27-31, 2000.
- LENTZ, D. L.; POHL, M. D. L.; ALVARADO, J. L.; TARIGHAT, S.; BYE, R. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) as a pre-Columbian domesticate in Mexico. **Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 17, apr. 2008.
- LIMA, A. O. S.; RODRIGUES, A. L. Sacarificação de resíduos celulósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v.1, n 2, p. 5-18, 2005.
- LINDE, M.; JAKOBSSON, E.L.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Stream pretreatment of dilute H₂SO₄ impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 326 – 332. 2008;
- LUO, P.; LIU, Z.; **Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw**. In: International Conference on Challenges in Environmental Science and Computer Engineering, p, 48 – 51, 2010.
- MACEDO, A. L.; SANTOS, R. S.; PANTOJA, L.; SANTOS, A. S. Pequi cake composition, hydrolysis and fermentation to bioethanol. **Revista Brasileira de Engenharia Química**. São Paulo, v. 28, n. 1, 2011.
- MACIEL, M. P.; SOARES, T. M.; GHEYI, H. R.; REZENDE, E. P. L.; OLIVEIRA, G. X. S. Produção de girassol ornamental com uso de águas salobras em sistema hidropônico NFT. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v. 16, n. 2, 2012.
- MALONEY, M. T.; CHAPMAN, T. W.; BAKER, A. J. Dilute acid hydrolysis of paper birch: kinetics studies of xylan and acetyl-group hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**. New York, v. 23, n. 3, p. 355-361, 1985.
- MANZANARES, P.; NEGRO, M. J.; OLIVA, J. M.; SAÉZ, F.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M.; CARA, C.; CASTRO, E.; RUIZ, E. Different process configurations for bioethanol production from pretreated olive pruning biomass. **Journal of Chemical Technology**, v. 86, n. 6, p. 881-887, 2011.
- MARTIN, C.; ALRIKSSON, B.; SJODE, A.; NILVEBRANT, N. O.; JONSSON, L. J. Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 137, n. 12. p. 339-352, 2007.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington v. 31, n.3, p. 426-428, 1959.
- MILLS, T.; SANDOVAL, N.; GILL, R. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. **Biotechnology for Biofuels**, Londres, v. 26, n. 2, p. 2-11, 2009.

- MORAES, E. J. C. **Estudo da viabilidade econômica da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada**. 2008. 157 f. Tese (Doutor) - Curso de Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, New York, v. 96, p. 673-686, 2005.
- MUELLER, M.; WILKINS, M. R.; BANAT, I. M. Production of xylitol by the thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains. **Bioprocessing & Biotechniques**, Los Angeles, v. 1, n.2, 2011.
- MUSSATO, S. I. **Influência do Tratamento do Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz na produção de xilitol por *Candida guilliermondii***. 2002. 173 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2002.
- MUSSATO, I. S.; ROBERTO, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.28, p. 34-39, 2002.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 94-100, jan-mar. 2004 .
- NAJAFPOUR, G.; IDERIS, A.; SALMANPOU, S.; NOROUZI, M. Acid hydrolysis of pretreated palm oil lignocellulosic wastes. **International Journal of Engineering Transactions A and B**. Tehran, p. 147-156.
- NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUM, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 98-100, p. 49-58, 2002.
- NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal Biotechnology**, Amsterdam, v.87, n. 1, p. 17-27, 2001.
- NONKLANG, S.; ABDEL-BANAT, B. M. A.; CHA-AIM, K.; MOONJAI, N.; HOSHIDA, H.; LIMTONG, S.; YAMADA, M.; AKADAI, R. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 24, p. 1854 -1858, dez. 2008.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.
- OLIVEIRA, M. D. S. **Torta da prensagem a frio na alimentação de bovinos**. In: XV Reunião Nacional da Cultura de Girassol, 3, 2003, Ribeirão Preto, 2003.
- OLIVEIRA, M. D. S.; MOTA, D. A.; BARBOSA, J. C.; STEIN, M.; BORGONOV, F. Composição bromatológica e digestibilidade ruminal in vitro de concentrados contendo diferentes níveis de torta de girassol. **Ciência Animal Brasileira**, Goiania, v. 8, n. 4, p. 629-638, 2007.
- OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, Londres, v. 1, n. 7, p. 1-14, 2008.

OLOFSSON, K.; PALMQVIST, B; LIDÉN, G. Improving simultaneous saccharification and cofermentation of pretreated wheat straw using both enzyme and substrate feeding. **Biotechnology for Biofuels**. Londres, v. 3, n. 17, p. 2-9, ago. 2010.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, New York, v. 74, p. 69-80, 2000.

PARAJÓ, J.C., DOMINGUEZ, H., DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysate. **Bioresource Technology**, London, v.66, p.25-40, 1998.

PEREZ, E. E.; CARELLI, A. A. CAPRISTE, G. H. Temperature-dependent diffusion coefficient of oil from different sunflower seeds during extraction with hexane. **Journal of Food Engineering**, London, v. 105, n.1, p. 180-185, 2011.

PIMENTEL, D.; PATZEK, T. W. Ethanol Production Using Corn, Switchgrass, and Wood; Biodiesel Production Using Soybean and Sunflower. **Natural Resources Research**, New York, v. 14, n. 1, p. 65-76, 2005

PINTO, L.; NETO, M. A.; BACARIN, M. A.; CASTELLÓN, R. R.; GADELHA, T. S.; GADELHA, C. A.; CAVADA, B. S. Caracterização química e bioquímica de sementes de *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, n. 3, p. 385-390, 2005.

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURAN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulasas: efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 140-143, mar-abr. 1998.

ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; SUNAO, S. Bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate for the production of xylitol – effect of pH and nitrogen source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York v. 57-58, p. 339-347, 1996.

RODRIGUES, C. P.; CAMARGO, J. A. **Bagaço de cana-de-açúcar como potencial para co-geração de energia elétrica e etanol celulósico**. 2008. 38 f. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colégio Iara Maria Coimbra, São Joaquim da Barra, 2008.

ROSSI, R. O. **Girassol**. Curitiba: Tecnoagro. 333p.1998.

ROUHOLLAH, H.; IRAJ, N.; GITI, E.; SORAH, A. Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Sacharomyces cerevisiae*, and an isolated xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their cultures. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi v. 6, n. 9, p. 1110-1114, 2007.

RUIZ, E.; CARA, C.; BALLESTEROS, M.; MANZANARES, M.; BALLESTEROS, I.; CASTRO, E. Ethanol production from pretreated olive tree wood and sunflower stalks by an SSF process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v.130, p. 631-643, 2006.

SACHS, I. **A revolução energética do século XXI**. Estudos avançados, São Paulo, v. 21, n. 59, p. 21-38, abr. 2007.

SAITO, I. M.; CABELLO, C. Produção de etanol a partir do hidrolisado obtido por tratamento hidrotérmico de farelo de mandioca. **Energia Agrícola**, Botucatu, v. 21, n. 3,; p. 34-44, 2006.

SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V.; CASTRO, E.; MOYA, A.; CAMACHO, F. The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester Sussex, v. 77, p. 641-648, 2002.

SANNIGRAHI, P.; PU, Y.; RAGAUSKAS, A. Cellulosic biorefineries – unleashing lignin opportunities. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, New York, v. 2, n. 5, p. 383-393, 2010.

SANTOS, D.; SILVA, S. Aproveitamento de resíduos agroindustriais em bioprocessos: como matéria-prima e suporte de imobilização de células. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 46, p. 56-69, mai. 2010.

SANTOS, E. R.; BARROS, H. B.; CAPONE, A.; FERRAZ, E. C.; FIDELIS, R. R. Efeito de épocas de semeadura sobre cultivares de girassol, no sul do estado de Tocantins. **Revista Ciência Agrônômica**. Fortaleza, v. 43, n. 1, 2012.

SANTOS, J. R. A. dos; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R.; MARTIN, C. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 4, 2010.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina grande, v. 11, n. 1, p. 27-33, 2009.

SARAÇOGLU, N. K.; ÇAVUSOGLU, H. Fermentative performance of *Candida tropicalis* Kuen 1022 yeast for D-Xylose and sunflower seed hull hydrolysate in xylitol production. **Journal of Engineering and Environmental Science**, Iowa, v. 23, p. 433–438, 1999.

SBARTAI, C. G.; LEYRIS, J.; RIGAL, L. Sunflower cake as a natural compositae: composition and plastic properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington. v. 56, n. 23, p. 11198–11208, 2008.

SENDELIUS, J. **Steam pretreatment optimization for sugarcane bagasse in bioethanol**. Master of Science Thesis Department of Chemical Engineering, Lund University, Sweden, 2005.

SENE, L; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S.; VITOLLO, M. Preliminary kinetic characterization of xylose reductase and xylitol dehydrogenase extracted from *Candida guilliermondii* FTI 20037 cultivated in sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 91-93, p. 671-680, 2001.

SHARMA, S. K.; KALRA, K. L.; GREWAL, H. S. Fermentation of enzymatically saccharified sunflower stalks for ethanol production and its scale-up. **Bioresource Technology**, New York, v.85, p.31-33, 2002.

SHARMA, S. K.; KALRA, K. L.; KOCHER, G. S. Fermentation of enzymatic hydrolysate of sunflower hulls for ethanol production and its scale-up. **Biomass & Bioenergy**, Reino Unido, v.27, p. 399-402, 2004.

SHUPE, A. M.; LIU, S. Effect of Agitation Rate on Ethanol Production from Sugar Maple Hemicellulosic Hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, 2011.

SILVA, J. P. A.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, J. A.. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. **Revista Brasileira**

de **Engenharia Química**, São Paulo, v. 28, n. 1, 2011.

SILVA, N. L. C. BETANCUR, M. P. V.; GOMES, E. B.; PEREIRA-JR, N. Ethanol production from residual wood chips of cellulose industry: acid pretreatment investigation, hemicellulosic hydrolysate fermentation and remaining solid fraction fermentation by SSF process. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Clifton, v. 163, p. 928–936, 2011.

SILVA, R; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELARAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. **Conversão da celulose pela tecnologia organosolv**. São Paulo: Naippe, 29 p., 3 v, 2007.

SOUTENBURG, R. M.; PERROTTA, J. A.; AMIDON, T. E.; NAKAS, J. Ethanol production from a membrane purified hemicellulosic hydrolysate derived from sugar maple by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Bioresources**, Guangzhou, v. 3, n. 4, p. 1349 - 1358, 2008.

SOUZA, A. D. V. de; FAVARO, S. P.; ITAVO, L. Ca. V.; ROSCOE, R. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-manso, nabo-forrageiro e crambe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 10, p. 1328-1335, out. 2009.

STENBERG, K. BOLLOK, M; RÉCZEY, K.; ZACCHI, G. Effect of substrate and cellulase concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated softwood for ethanol production. **Biotechnology and bioengineering**, New York, v. 68; n. 2, p. 201–210, 2000.

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature reviews**. Michigan, v. 9, p. 433-443, 2008.

SUN, Y.; CHENG, J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource technology**. New York, v. 96, p. 1599-1606, 2005.

SUN, Y; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource technology**. New York, v. 83, n. 1, p. 1-11, may. 2002.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresource Technology**. New York, v. 2, p. 472–499, 2007.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, Suíça, v. 9, n. 9, p. 1621-1651 Set. 2008.

TOIVOLA, A.; YARROW, D.; BOSCH, E. V. D.; DIJKEN, J. P. V.; SCHEFFERS, A. Alcoholic Fermentation of D-Xylose by Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n. 47, v. 6, p. 1221-1223, 1984.

TAMANINI, C; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 315-330. 2004.

TÉLLEZ-LUIZ, S. J.; RAMÍREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M. Modeling of the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. **Journal of the science of food and agriculture. Oxford**, v. 82, p. 505 – 512.

TELLI-OKUR, M.; EKEN-SARAÇOĞLU, N. Ethanol production from sunflower seed hull hydrolysate by *Pichia stipitis* under uncontrolled pH conditions in a bioreactor. **Journal of Engineering and Environmental Sciences**, Turquia, v. 30, p. 317-322, 2006.

TELLI-OKUR, M.; EKEN-SARAÇOĞLU, N. Fermentation of sunflower seed hull hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, p. 2162–2169, 2008.

TOMÁS-PEJÓ, E.; GARCIA-APARICIO, M; NEGRO, M. J.; OLIVA, J. M.; BALLESTEROS, M. Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. **Bioresource Technology**, New York, v. 100, n. 2, p. 890-895, jan.2009.

TSAO, G. T. Structures of cellulosic material and their hydrolysis by enzymes. In: ALANI, D. I.; MOO-YOUNG, M. **Biotechnology and Applied Microbiology**, New York: p. 205-212, 1986.

VAN CLEEF, E. H. C.B. **Tortas de nabo forrageiro (*Raphanus sativus*) e pinhão manso (*Jatropha curcas*): caracterização e utilização como aditivos na ensilagem de capim elefante**. 2008. 77 pg. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Lavras, Lavras.

YOSHIDA, M.; LIU, Y.; UCHIDA, S.; KAWARDA, K.; UKAGAMI, Y.; ICHINOSE, H.; KANEKO, S.; FUKUDA, K. Effects of cellulose crystallinity, hemicellulose, and lignin on the enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* to monosaccharides. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 72, n. 3, p 805-810, 2008.

ZHENG, Y; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agriculture and Biology**, Madrid, v. 2, n. 3, p. 23-68, 2009

