

Flávia Nunes Costa

**VALORIZAÇÃO DE LANDOLTIA PUNCTATA
PROVENIENTE DE TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO
ATRAVÉS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA VISANDO A
PRODUÇÃO DE ETANOL**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Débora de Oliveira

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Costa, Flávia Nunes

Valorização de *Landoltia punctata* proveniente de tratamento de esgoto doméstico através de hidrólise enzimática visando a produção de etanol / Flávia Nunes Costa ; orientador, Jorge Luiz Ninow ; coorientadora, Débora de Oliveira. - Florianópolis, SC, 2014.
103 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Lemnas. 3. *Landoltia punctata*. 4. Hidrólise enzimática. 5. Acúmulo de amido. I. Ninow, Jorge Luiz . II. Oliveira, Débora de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Dedico aos meus pais Salvador e Eunice, e ao meu irmão Mateus pelo apoio e amor incondicional. Vocês são essenciais em tudo na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por ser minha companhia constante. Por ter me abençoado sempre com saúde e cuidado dos meus quando eu estava longe. Obrigada, Senhor!

Aos meus pais Salvador e Eunice, que não mediram esforços para eu realizar esse sonho e foram minha fortaleza nos momentos de desânimo. Ao meu irmão Mateus pelo apoio e incentivo. A minha família pelas orações e carinho. Eu amo vocês.

Ao meu orientador Jorge Luiz Ninow e a minha coorientadora Débora de Oliveira pelos ensinamentos, dedicação e confiança em mim depositada.

Ao Rodrigo por ceder a biomassa utilizada neste trabalho, por ter disponibilizado infraestrutura para realização dos experimentos de enriquecimento e ter se mostrado sempre solícito.

As minhas amigas Laura, Marla e Jacqueline pelo companheirismo, momentos de estudo e de descontração durante o mestrado. A Majo pela disponibilidade, empenho e amizade sincera. A Eliane e Raquel pelo companheirismo e as boas risadas. Ao Lindomar pela sua contribuição e presteza. A Luciana que me ajudou na realização desse trabalho e me repassou seus conhecimentos.

A todos os amigos do Programa de Pós-Graduação: Guilherme, Helmut, Denise, Ricardo, Douglas, Angelise, Isadora, Manuela, Vanessa, Luís, Evertan e Fred pelos bons momentos e união.

Aos colegas do Engebio pelas sugestões e colaboração.

A CAPES pelo apoio financeiro e ao PGEAL-UFSC pela oportunidade e infraestrutura que permitiu a realização deste trabalho.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”
(Simone de Beauvoir)

RESUMO

A necessidade de se explorar novas fontes de energia renovável e limpa vem exigindo o desenvolvimento de biocombustíveis, por serem considerados uma alternativa promissora aos combustíveis tradicionais. Nesse contexto, as lemnas vêm ganhando interesse em pesquisas, por não competirem com culturas alimentícias e terras produtivas para produção de etanol. O objetivo deste trabalho foi a valorização da biomassa de lemnas (*Landoltia punctata*), produzidas em sistema de tratamento de esgoto, através de hidrólise enzimática do amido e celulose em açúcares fermentescíveis. Para tal, a biomassa seca (55 °C por 24 horas) e triturada foi caracterizada quanto à umidade (6,57%), amido (6,53%), celulose (12,83%), proteína bruta (34,27%) e cinzas (10,54%). Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados em modo batelada visando o estudo da etapa de sacarificação. Foi então utilizado um planejamento tipo Plackett-Burman (12 ensaios, 6 variáveis e triplicata no ponto central), cujas variáveis estudadas foram: pH (3,0 a 6,0), temperatura (45 a 65 °C), concentração de Spirizyme Fuel (0,1 a 0,3% v/m, em relação à biomassa), concentração de Pectinex Ultra AFP (0 a 0,1% v/m, em relação à biomassa), concentração de Cellic Ctec2 (0 a 6% v/m, em relação à biomassa) e concentração de Cellic Htec2 (0 a 0,5% v/m, em relação à biomassa). A variável resposta foi a concentração de glicose. Depois de observadas as variáveis significativas, que foram a temperatura e a concentração de Cellic Ctec2, realizou-se planejamento fatorial completo 2², com triplicata do ponto central e totalizando 7 experimentos. A partir dos resultados obtidos as condições da sacarificação foram definidas: pH 6,0, temperatura de 45 °C, concentração de Spirizyme Fuel 0,1% (v/m) e de Cellic Ctec2 6% (v/m) por 2 horas. Nestas condições, o hidrolisado apresentou pH de 5,9, concentração de glicose de 6,02 g/L e 3,52 °Brix. Também foi avaliado o acúmulo de amido quando a espécie de lemnas estudada (*Landoltia punctata*) era submetida a privação de nutrientes, obtendo-se até 5 vezes a quantidade inicial. Estes resultados indicam que a biomassa de lemnas tem potencial para produzir quantidades significativas de amido, que juntamente com sua fração de celulose, podem ser convertidos em etanol.

Palavras-chave: Lemnas, *Landoltia punctata*, hidrólise enzimática, acúmulo de amido

ABSTRACT

The necessity of explore new renewable and clean energy sources energy has required the development of biofuels because they are considered a promising alternative to traditional fuels. In this context, the duckweed have been gaining interest in research, for not competing with food crops and farmland to ethanol production. The aim of this study was to enhance the duckweed biomass (*Landoltia punctata*), produced in wastewater treatment system, by enzymatic hydrolysis of its starch and cellulose into fermentable sugars. For that, the dry biomass (at 55 °C for 24 hours) was crushed and characterized for moisture content (6.57%), starch (6.53%), cellulose (12.83%), crude protein (34.27%) and ash (10.54%). The enzymatic hydrolysis experiments were performed in batch mode and the saccharification step was studied using a Plackett-Burman experimental design (12 trials, 6 variables and triplicate at the central point), which variables were: pH (3.0 to 6.0), temperature (45 to 65 °C), Spirizyme Fuel concentration (0.1 to 0.3% v/w, relative to biomass), Pectinex Ultra AFP concentration (0 to 0.1% v/w, relative to biomass) Cellic Ctec2 concentration (0 to 6% v/w, relative to biomass) and Cellic Htec2 concentration (0 to 0.5% v/w, relative to biomass). The response variable was the glucose concentration. After determining the significant variables, which were the temperature and concentration of Cellic Ctec2, was held a 2² full factorial design, with triplicate of the center point being a total of 7 experiments. From the results obtained, the saccharification conditions were defined as: pH 6.0, temperature 45 °C, concentration of Spirizyme Fuel 0,1% (v/w) and Cellic Ctec2 6% (v/w) and reaction time of 2 hours. In these conditions, the hydrolyzate showed a glucose concentration of 6.02 g/L, pH of 5.9 and 3.52 °Brix. It has also been verified that the specie of duckweed studied (*Landoltia punctata*), increase its starch concentration, up to 5 times the initial amount, when subjected to nutrient deprivation. These results indicate that duckweeds biomass has the potential to produce significant amounts of starch, which together with a cellulose fraction can be converted into ethanol.

Keywords: Duckweed, *Landoltia punctata*, enzymatic hydrolysis, starch accumulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Landoltia punctata.	26
Figura 2 - a) Ligações α -1,4 da molécula de amilose. b) Ligações α -1,4 e α -1,6 da molécula de amilopectina.	33
Figura 3 - Estrutura química da celulose.	34
Figura 4 - Ação da enzima α -amilase sobre as frações do amido, amilose e amilopectina.	38
Figura 5 - Ação do complexo celulase na hidrólise da celulose e compostos intermediários.	41
Figura 6 - Fluxograma geral da pesquisa.	47
Figura 7 - Farinha de lemnas.	48
Figura 8 - Banho termostatizado com agitação usado na etapa de liquefação.	54
Figura 9 - Shaker com agitação orbital utilizado na etapa de sacarificação.	54
Figura 10 - Transferência de biomassa para primeiro experimento de enriquecimento.	60
Figura 11 - Sistema de iluminação utilizado em experimento de enriquecimento com fotoperíodo controlado.	60
Figura 12 - Cinética prévia para determinação do tempo de sacarificação.	67
Figura 13 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito das variáveis na concentração de glicose ($p < 0,1$).	69
Figura 14 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito da temperatura e da concentração de Cellic Ctec2 na produção de glicose ($p < 0,1$). Os dados experimentais estão indicados na Tabela 10.	72
Figura 15 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito das variáveis temperatura e concentração de Cellic Ctec2 sobre a produção de glicose ($p < 0,1$) com os dados experimentais da Tabela 11.	74
Figura 16 - Cinética final para determinação do tempo de sacarificação.	76
Figura 17 - Teor de amido em função do tempo após transferência das lemnas para água sem nutrientes.	79
Figura 18 - Teor de amido em função do tempo em experimentos de escassez de nutrientes.	80
Figura 19 - Acúmulo de amido em biomassa transferida para água de torneira e para água destilada.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação da composição nutricional de lemnáceas em base seca.....	29
Tabela 2 - Preparo da solução de reação da amostra, controle de substrato, controle de enzima e branco para atividade de α -amilase....	49
Tabela 3 - Alíquotas da solução de reação da amostra e branco para análise da atividade enzimática da amiloglucosidase.....	50
Tabela 4 - Alíquotas para preparo do branco, amostra e padrão para determinação de concentração de glicose.....	51
Tabela 5 - Preparo das reações de amostra, branco, controle de enzima e de substrato para realização da etapa inicial da análise de determinação de atividade da celulase.....	52
Tabela 6 - Faixa de estudo das variáveis independentes da matriz de planejamento para produção de glicose através de hidrólise enzimática.	56
Tabela 7 - Composição da farinha de lemnas em base seca.	63
Tabela 8 - Atividade enzimática da α -amilase, amiloglucosidade e celulase.....	66
Tabela 9 - Matriz do planejamento de experimentos Plackett-Burman (valores reais e codificados) com resposta em termos de concentração de glicose.	68
Tabela 10 - Matriz do planejamento de experimentos fatorial (valores reais e codificados) com resposta em termos de concentração de glicose.	71
Tabela 11 - Matriz do segundo planejamento de experimentos fatorial (valores reais e codificados) com as respostas em termos de concentração de glicose.....	73
Tabela 12 - Efeito das diferentes concentrações de Cellic Ctec2 sobre a concentração de glicose.....	75
Tabela 13 - Valores médios para os parâmetros glicose, pH e sólidos solúveis do hidrolisado.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amilo – Relativo a amiloglucosidade Spirizyme Fuel
Ctec – Relativo a celulase Cellic Ctec2
DBO – Demanda bioquímica de oxigênio
Ens – Ensaio
EUA – Estados Unidos da América
g- Grama
h - Hora
Htec – Relativo a hemicelulase Cellic Htec2
L – Litro
mg – Miligrama
mL – Mililitros
mM – Milimolar
MP – Matéria-prima
 η m - Nanômetro
p/p – Peso/peso
Pect – Relativo a pectinase Pectinex Ultra AFP
rpm – Rotação por minuto
v/m – Volume por massa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 OBJETIVOS.....	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 LEMNAS.....	25
2.1.1 Aspectos gerais	25
2.1.2 Utilização de lemnas	27
2.2 AMIDO.....	32
2.3 CELULOSE.....	33
2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	35
2.4.1 Hidrólise enzimática do amido	35
2.4.2 Hidrólise enzimática da celulose	39
2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE.....	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 MATERIAL.....	45
3.1.1 Matéria-prima	45
3.1.2 Enzimas.	45
3.2 MÉTODOS.....	46
3.2.1 Preparo e caracterização físico-química da matéria-prima	48
3.2.2 Determinação da atividade enzimática	48
3.2.3 Avaliação da hidrólise enzimática	53
3.2.4 Obtenção e caracterização do hidrolisado	56
3.2.5 Análises físico-químicas	57
3.2.6 Enriquecimento em amido	59
3.2.7 Análise estatística	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA.....	63
4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	65
4.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	66
4.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO HIDROLISADO.....	77
4.5 ENRIQUECIMENTO EM AMIDO.....	78
5 CONCLUSÕES	85
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
7 REFERÊNCIAS	89

8 APÊNDICE A – ANÁLISE DE AMIDO..... 101

1 INTRODUÇÃO

Com uma demanda cada vez maior por energia renovável e também limpa, esforços mundiais estão sendo dirigidos para o desenvolvimento de processos tecnológicos ambientalmente não nocivos e eficientes para a conversão de biomassa em combustíveis de energia e de transporte (MURADOV et al., 2010). Aliado a isso, o declínio das reservas de combustíveis fósseis (petróleo, carvão mineral e gás natural), a poluição ambiental e o aumento cada dia maior dos preços estão entre os muitos problemas de energia que se enfrenta hoje, exigindo assim, o desenvolvimento de combustíveis alternativos, como os biocombustíveis, que são considerados uma alternativa promissora aos combustíveis tradicionais.

Os biocombustíveis podem reduzir as emissões de gases de efeito estufa e atender essa crescente demanda mundial por energia. Atualmente, o etanol é produzido principalmente em escala industrial a partir de matérias-primas que contêm amido e açúcar, como o milho nos EUA e a cana-de-açúcar no Brasil (SANCHEZ; CARDONA, 2008). No entanto, estes modos de produção de etanol têm alguns problemas inerentes, incluindo a segurança alimentar, meio ambiente e a insuficiência de terras agrícolas (CHEN et al., 2012). Assim, explorar matérias-primas alternativas é um tema urgente.

A lemna é conhecida popularmente no Brasil como “lentilha d’água” ou “marrequinha”, pertencente ao gênero de plantas aquáticas da subfamília *Lemnoideae*. Essas plantas podem ser cultivadas em praticamente qualquer local e clima, embora prefiram climas quentes e úmidos, e já vem sendo utilizada com sucesso no tratamento de águas residuais. Mohedano (2010) estudou o uso de lagoas de lemnáceas (*Landoltia punctata*) para o polimento e valorização de efluentes proveniente de suinocultura. No referido estudo sua eficiência foi avaliada, onde foi possível obter um efluente clarificado, sem a turbidez característica da presença de algas e sólidos em suspensão.

Essas plantas possuem como principal vantagem acumular biomassa a velocidades mais rápidas do que outras plantas superiores, incluindo culturas agrícolas, apresentando um tempo de duplicação de 2-7 dias (ORON; PORATH; WILDSCHUT, 1986; LANDOLT; KANDELER, 1987).

A espécie utilizada nesse estudo foi *Landoltia punctata*, cuja ocorrência foi verificada na região litorânea de Santa Catarina

(MOHEDANO, 2010). Em uma pesquisa de Bergman e colaboradores (2000), essa espécie se destaca em primeiro lugar no ranking para produção de proteína e remoção de nitrogênio em efluentes sintéticos de suinocultura entre 41 cepas analisadas. Como fator determinante de interesse, estudos anteriores indicaram sua capacidade de acumular um teor elevado de amido (3 a 75%) dependendo das condições de cultivo (REID; BIELESKI, 1970 apud CHEN et al., 2012). Aliado a isso, por ser uma espécie aquática, a pequena quantidade de lignina e a deficiência em hemicelulose facilita a conversão da fração de celulose em etanol, potencializando a utilização dessa matéria-prima (GE et al, 2012).

Deste modo, as lemnas podem ser consideradas candidatas promissoras para a produção de etanol através da hidrólise enzimática do amido e da celulose e posterior fermentação dos açúcares produzidos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Valorização da biomassa de lemnas obtidas em sistemas de tratamentos de efluentes domésticos através da transformação do seu amido e celulose por hidrólise enzimática em açúcares fermentescíveis.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar físico-quimicamente a biomassa.
- Definir a melhor condição para a sacarificação enzimática do amido e da celulose presente na biomassa.
- Caracterizar o hidrolisado obtido nas condições experimentais definidas na etapa anterior.
- Avaliar o acúmulo de amido promovido pela escassez de nutrientes, após a fase de crescimento das lemnas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEMNAS

2.1.1 Aspectos gerais

O termo *Lemna* designa um gênero de plantas aquáticas, onde a palavra *limnus*, originário do latim, significa lago, com relação ao seu habitat natural. Devido ao tamanho diminuto de suas flores e à simplicidade estrutural, a taxonomia desta família é difícil e divergente entre os autores. Com avanço da biologia molecular (análise de DNA) muitos especialistas têm desconsiderado a família *Lemnaceae* como classificação passando este grupo a ser uma subfamília (*Lemnoideae*) dentro *Araceae* (MOHEDANO, 2010). Nas bibliografias são popularmente conhecidas como “duckweeds” (erva-de-pato), “lentilhas d’água” ou somente “lemnas”, sendo descritos 5 gêneros: *Lemna*, *Wolffia*, *Landoltia*, *Spirodela* e *Wolffiella* e cerca de 40 espécies (JOURNEY; SKILLICORN; SPIRA, 1993).

A espécie utilizada neste trabalho foi *Landoltia punctata* (Figura 1), cuja classificação segundo Mohedano (2010) é apresentada a seguir:

Reino: Plantae

Divisão: Angiospermae

Classe: Monocotyledoneae

Ordem: Arales

Família: Araceae (*Lemnaceae*)

Sub-família: *Lemnoideae*

Gênero: *Landoltia*

Espécie: *Landoltia punctata*

Devido a popularização do termo, “*lemna*” vem sendo usado como um nome usual, inclusive para outros gêneros deste grupo botânico (MOHEDANO, 2010). Deste modo, no presente trabalho será empregado diversas vezes o termo “*lemnas*” como nome comum, desconsiderando as regras de nomenclatura científica, sob a qual o nome de um gênero deve estar sublinhado, ou em itálico.

Figura 1- *Landoltia punctata*.



Fonte: <http://www.vub.ac.be/APNA/research/Invasive/invasive.html>

São consideradas as menores plantas vasculares do mundo, sendo frequentemente confundidas com algas e encontradas em corpos de água doce ou com pouca salinidade (até 4 g/L) (JOURNEY; SKILLICORN; SPIRA, 1993). Geralmente formam densas populações, flutuando livremente sobre a superfície de lagoas ricas em matéria orgânica (LANDOLT; KANDELER, 1987).

Possui como principal vantagem acumular biomassa a velocidades mais rápidas do que outras plantas superiores, incluindo culturas agrícolas (HASSAN; EDWARDS, 1992), podendo dobrar sua biomassa em dois ou três dias dependendo da disponibilidade de nutrientes, da temperatura e luminosidade (JOURNEY; SKILLICORN; SPIRA, 1993). Em condições ideais, um tempo de duplicação de 20-24 h foi observada em *Wolffia microscopica* (KÖRNER; VERMAAT; VEENSTRA, 2003). No entanto, o crescimento das lemnas pode ser diminuído com a alta densidade de plantas, falta de nutrientes, valores extremos de pH e competição com outras plantas por luz e nutrientes. A remoção periódica da biomassa excedente e o manejo adequado nos nutrientes presentes na água garantem a melhoria das velocidades de reprodução (CULLEY; MYERS, 1978 *apud* FRANÇA et al., 2009).

Outra importante vantagem é a produção de biomassa de grande valor nutricional, chegando a mais de 40% de proteína bruta e apenas 15% de fibras (HASSAN; EDWARDS, 1992). Estudos mostram também que o teor de amido nessas plantas pode variar de 3 a 75% e ser consideravelmente aumentado por meio da manipulação das condições de crescimento, como a restrição de nutrientes, o que possibilita o seu aproveitamento em produtos de interesse (CHENG; STOMP, 2009).

2.1.2 Utilização de lemnas

A utilização dessas espécies é bastante variada. Em diversos países a capacidade desses vegetais no tratamento de efluentes e na produção de alimentos para animais tem sido estudada e utilizada com sucesso.

As lemnáceas coletadas, se cultivadas em esgoto doméstico livre de metais pesados e outros compostos tóxicos, podem ser utilizadas como adubo na agricultura e na produção de composto de alta qualidade (TAVARES, 2008). Pode ser utilizada como fonte de alimento rico em proteínas para animais, como peixes e aves. Além disso, o efluente gerado é adequado para irrigação (ORON; PORATH; JANSEN, 1987 *apud* TAVARES, 2008). Cheng e Stomp (2009) mostraram em sua pesquisa o potencial desses vegetais como matéria-prima para a produção de etanol.

2.1.2.1 Tratamento de efluentes

Estas plantas têm sido utilizadas para tratamento terciário de efluentes municipais desde a década de 1980 nos Estados Unidos da América (EUA), onde se aproveitam dos nutrientes poluentes existentes para seu crescimento (CHEN; STOMP, 2009).

O uso de lagoa de lemnas para tratamento de efluentes despertou interesse devido à sua rusticidade e eficiência. Algumas das principais características que favorecem a utilização desses vegetais no polimento de efluentes orgânicos segundo diversos autores, entre eles, Journey, Skillicorn e Spira (1993), Bonomo, Pastorelli e Zambon (1997), Hammouda, Gaber, Adbel-Hammed (1995), Iqbal (1999), Cheng et al. (2002), são:

- Elevada exigência de nitrogênio e fósforo;

- Apresentam as maiores velocidades de crescimento entre as plantas vasculares;
- Altas velocidades de remoção de DBO e sólidos suspensos;
- Impedem o crescimento e proliferação de algas devido à baixa penetração de luz;
- Criam um ambiente propício para a sedimentação ao diminuir a ação do vento;
- Reduzem a proliferação de insetos por barreira física;
- Possuem biomassa de elevada qualidade nutricional, agregando valor econômico ao tratamento.

As lemnas podem ser utilizadas no tratamento secundário (remoção de sólidos suspensos e DBO) e no tratamento terciário (controle de algas e remoção de nitrogênio). Entretanto, os sistemas de tratamento devem ser precedidos de adequado tratamento primário para evitar o acúmulo de lodo e material flutuante no tanque (BONOMO; PASTORELLI; ZAMBON, 1997).

Muitos estudos têm demonstrado a potencialidade de lagoas de lemnas no polimento do efluente da suinocultura. Pesquisadores da equipe dos doutores Cheng e Bergman, da Universidade Estadual da Carolina do Norte - EUA publicaram diversos trabalhos sobre a eficiência de lemnáceas no tratamento desses efluentes. Bergman et al. (2000) realizaram um estudo para selecionar a espécie de lemnácea com melhor desempenho no tratamento de dejetos suínos. Entre 41 cepas isoladas geograficamente, de 12 espécies diferentes, a espécie de primeira posição no *ranking* foi *Landoltia punctata*. Os parâmetros avaliados foram remoção de nutrientes (N e P), taxa de crescimento e produção de proteína.

Mohedano (2010) realizou um estudo em Santa Catarina com o uso de lagoas de *Landoltia punctata* para o polimento e valorização de efluentes provenientes da suinocultura. No referido estudo a eficiência das lemnas neste tipo de tratamento foi avaliada, onde foi possível obter um efluente clarificado, sem a turbidez característica da presença de algas e sólidos em suspensão, apresentando um elevado potencial na remoção de nutrientes, além da redução de fósforo e matéria orgânica. Destacando-se ainda como vantagem o aproveitamento da biomassa de lemnas como alimento animal da propriedade rural, trazendo assim benefícios econômicos e servindo de contrapartida para a implantação do sistema de tratamento.

Devido à importância econômica da suinocultura no Estado de Santa Catarina, que se destaca como principal produtor nacional de suínos, e essa atividade ser de grande impacto ambiental para os recursos hídricos, devido à geração de efluentes com alto potencial poluidor, a utilização de lemnas para o seu tratamento pode, além de reduzir a carga de efluentes orgânicos, gerar economia no processo com a valorização biotecnológica deste subproduto, contribuindo para a sustentabilidade da atividade.

2.1.2.2 Alimentação animal

Segundo Iqbal (1999), o cultivo de lemnáceas é considerado uma tecnologia potencial para combinar o tratamento de efluentes e a produção de alimento, devido à baixa porcentagem de fibras e o elevado valor nutricional. Em ambientes naturais, as lemnáceas constituem um importante recurso alimentar para aves aquáticas, peixes e insetos (POTT, 2000).

Segundo Journey, Skillicorn e Spira. (1993), o teor de proteína de lemnas é um dos mais altos no reino vegetal, porém é dependente das condições de crescimento. Quando cultivadas em meios ricos em nutrientes, podem apresentar níveis altos de proteína e baixo de fibras e quando cultivadas em águas pobres em nutrientes podem apresentar níveis de proteína altos e níveis de fibra maiores. A variação na composição é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Variação da composição nutricional de lemnáceas em base seca.

Composição	%
Proteína	6,8 – 45,0
Lipídio	1,8 – 9,2
Fibra	5,7 – 16,2
Carboidrato	14,1 – 43,6
Cinzas	12,0 – 27,6

Fonte: Landolt e Kandeler (1987).

Além do alto teor de proteína contido nessas plantas, outros componentes importantes também são encontrados. Landolt e Kandeler (1987) relatam a presença de 40 minerais diferentes e 6 vitaminas (A, B1, B2, B6, C, E). No entanto, a quantidade de lipídios contidas nas

lemnáceas é extremamente baixa, sendo necessário complementos ricos em gordura para a alimentação animal constituída à base de farinha de lemna.

Devido ao bom valor nutricional dessas plantas e por apresentarem boa digestibilidade, diversos pesquisadores têm direcionado estudos a fim de testar sua eficiência na alimentação de animais de criação, principalmente para aves e peixes. Sendo que a utilização de lemnáceas na alimentação de peixes é a forma mais comum e difundida de aplicação da biomassa produzida. Podem ser fornecidas em sua forma fresca, como único alimento, ou desidratada, em combinação com outras fontes de alimento em cultivos de carpas e tilápias (IQBAL, 1999).

2.1.2.3 Produção de etanol

Os biocombustíveis líquidos, como o etanol, obtidos a partir de biomassa são considerados uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis, em um esforço para reduzir as emissões de gases causadores do efeito estufa e atender a cada vez maior demanda global por energia. Atualmente, o etanol é produzido principalmente em escala industrial a partir de matérias-primas que contêm amido e açúcar, como o milho nos EUA e cana-de-açúcar no Brasil (SANCHEZ; CARDONA, 2008). No entanto, essas matérias-primas utilizadas na produção de etanol têm alguns problemas inerentes, com impactos negativos sobre a segurança alimentar, meio ambiente e a insuficiência de terras agrícolas. O mesmo dilema existe na produção de etanol a partir de outras matérias-primas que contêm carboidratos em abundância, tais como batata-doce e mandioca, que têm o potencial de ser convertido em etanol (CHEN et al., 2012).

Embora as fontes lignocelulósicas também sejam consideradas matéria-prima promissora para a produção de etanol, existem ainda vários obstáculos a serem superados como a falta de um processo de pré-tratamento que cause impacto reduzido ao meio ambiente, além de eficiente e econômico.

No cenário atual, o elevado custo de biocombustíveis é o maior obstáculo à sua comercialização, limitando a sua produção em grande escala. O principal fator econômico a considerar para os custos de sua produção é a matéria-prima, que consiste em cerca de 80% do custo operacional total (DEMIRBAS, 2008). Portanto, é necessário explorar

novas fontes alternativas de biocombustível que sejam adequadas e baratas, permitindo assim competir com os derivados do petróleo.

Nesse sentido, as lemnas têm ganhado cada vez mais atenção, sendo nos EUA investigada como uma nova tecnologia para complementar a produção de etanol à base de milho (CHENG; STOMP, 2009).

Essas plantas são consideradas como ideais por serem adaptáveis as mais variadas localidades e climas e não competirem com culturas alimentares. Além disso, outra característica vantajosa inclui sua velocidade de crescimento mais rápida do que outras plantas superiores, incluindo culturas agrícolas (LANDOLT; KANDELER, 1987), podendo dobrar sua biomassa em dois dias, sob condições ideais (LANDESMAN et al., 2005). Podem também ser facilmente recuperadas do meio de cultura por um processo de separação simples (XU; SHEN, 2011) e, como característica mais importante, são capazes de acumular amido. Dependendo da espécie e das condições de crescimento, a porcentagem de amido em lemnas varia de 3% a 75% em peso seco (LANDOLT; KANDELER, 1987). Sob condições de crescimento ricas em nutrientes, as lemnáceas têm um percentual relativamente baixo de amido. Mas, manipulando as condições de cultivo, incluindo o ajuste de pH, a concentração de fosfato e o estado nutricional (escassez de nutrientes), o seu percentual de amido pode ser significativamente aumentado (CUI, et al., 2011; XU; SHEN, 2011). Esses resultados indicam que a biomassa de lemna pode produzir quantidades significativas de amido, que pode ser prontamente convertido em etanol.

Teores de amido de 31,0-45,8% do peso seco foram obtidos após submissão ao estresse de nutrientes (retirada de água rica em nutriente para outra com poucos nutrientes) durante 5-10 dias, e até 94,7% de amido pode ser convertido a etanol usando as tecnologias já existentes para a conversão do amido de milho (XU et al., 2012).

Aliado a isso, as lemnas são produzidas em águas residuárias, contribuindo para o tratamento desses efluentes e excluindo a necessidade de insumos agrícolas e o uso de terras produtivas.

Como uma alternativa promissora, as lemnas têm ganhado ultimamente o interesse não só dos pesquisadores como também dos governos. Em 2009, o Departamento de Energia dos Estados Unidos apoiou um projeto para sequenciar o genoma de *Spirodela polyrhiza*. Apoiado pelo ministro da Ciência e Tecnologia, a China lançou um projeto para produzir biocombustíveis líquidos a partir da

biomassa de lemnáceas e a primeira conferência internacional sobre aplicação e pesquisa de lemnas foi realizada em Chengdu, na China, em outubro de 2011 (TAO et al., 2013).

Como uma espécie aquática, a pequena quantidade de lignina e a deficiência em hemicelulose torna-se um importante fator, por aumentar e facilitar a conversão da biomassa em etanol (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008). Muito embora o amido seja o componente de maior interesse para sua produção, a conversão da fração de celulose em etanol potencializa a utilização da matéria-prima.

2.2 AMIDO

O amido é o maior polissacarídeo de reserva das plantas e o segundo mais abundante depois da celulose (SANTANA, 2007) e fornece de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem (VAN DER BURGT et al., 2000). Depois dos açúcares mais simples (glicose, frutose, sacarose e maltose), é o principal carboidrato que os vegetais sintetizam a partir da fotossíntese. Entre as matérias-primas para sua extração destacam-se as raízes, tubérculos e os cereais (FRANCO et al., 2002).

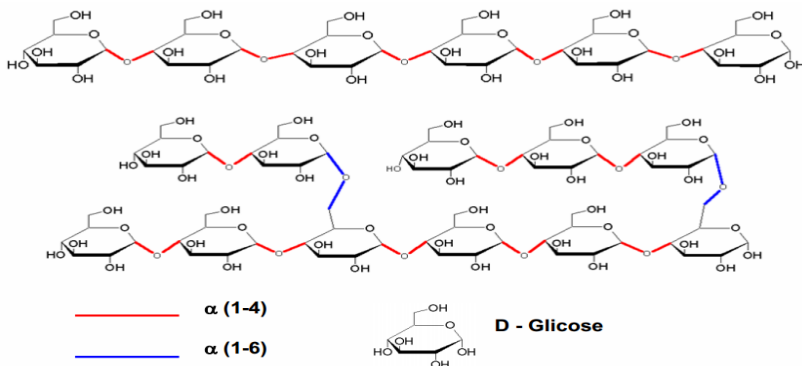
Os grânulos de amido diferem entre si na forma, tamanho e outras características físicas, de acordo com a planta de origem. Geralmente o tamanho do grânulo de amido fica na faixa de 1 a 100 μm e a sua forma varia bastante (FRANCO et al., 2002).

Em termos estruturais, o amido é um polímero composto de amilose e amilopectina. A amilose é composta de unidades de glicose polimerizadas por ligações glicosídicas α -1,4, de forma linear (Figura 2a). A segunda fração, amilopectina, é um polímero de maior peso molecular, onde as unidades de glicose estão unidas por ligações α -1,4 e α -1,6 em configuração ramificada (Figura 2b) (LEONEL; CABELLO, 2001).

A proporção existente entre a amilose e a amilopectina no grânulo de amido, assim como a sua organização física são responsáveis pelas propriedades físico-químicas e funcionais do amido e também pela sua susceptibilidade ao ataque enzimático, características particulares à fonte botânica a qual o amido é extraído. Geralmente os amidos contêm 15 a 30% de amilose e 70 a 85% de amilopectina, existindo algumas variedades de milho, sorgo, cevada e arroz referidas como “waxy” ou ceroso que contêm baixas quantidades de amilose, de 0 a 8%, assim

como amidos com alta quantidade da mesma (50 a 70%) (JANE et al., 1994).

Figura 2 - a) Ligações α -1,4 da molécula de amilose. b) Ligações α -1,4 e α -1,6 da molécula de amilopectina.



Fonte: Lopes (2006).

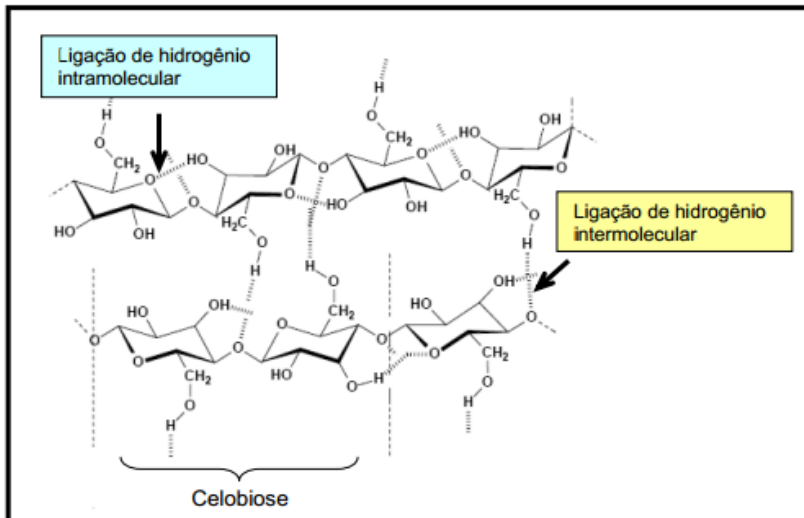
Há aplicações diversificadas para o amido, que vai além de sua função original como fonte de energia, sendo utilizado, assim como seus derivados, em quase todas as indústrias. Mas nem sempre o amido, na sua forma nativa, possui propriedades adequadas a determinados tipos de processamento. Deste modo, a hidrólise enzimática tem sido utilizada como técnica que possibilita a transformação do amido fermentescível em açúcares fermentescíveis, os quais podem ser convertidos em diversos produtos de interesse (LIMA et al., 2002).

2.3 CELULOSE

A celulose é o principal constituinte das plantas e o material orgânico mais abundante na natureza. É composta por unidades repetitivas de duas moléculas de glicose (celobiose) unidas por ligações β -1,4-glicosídicas e por ligações de hidrogênio intramoleculares (ligações entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes) (Figura 3) (ARANTES; SADDLER, 2010). Devido a essas ligações de

hidrogênio há uma forte tendência da celulose formar cristais que a tornam completamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos (SILVA et al. 2009).

Figura 3 - Estrutura química da celulose.



Fonte: Morais (2005).

As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez; e as ligações intramoleculares são responsáveis pela formação de fibrilas, estruturas altamente ordenadas que se associam formando as fibras de celulose. As fibrilas apresentam desde regiões com elevado grau de cristalinidade, nas quais as cadeias de glicana estão firmemente ligadas em paralelo, até regiões com menor grau de ordenação, chamadas de regiões amorfas. Na região cristalina, as fibras têm maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação (absorção de solvente) que na região amorfa, onde a fibra possui sua maior flexibilidade (VÁSQUEZ et al., 2007).

Apesar da sua simplicidade química, existe uma complexa gama de formas físicas de celulose devido principalmente à diversidade de origem e o conhecimento de suas propriedades como tamanho, forma, grau de polimerização, área superficial, cristalinidade e associação com

compostos não celulósicos são de suma importância para o processo de hidrólise (BEGUIN; AUBERT, 1994).

2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

As ligações glicosídicas, que unem as unidades de monossacarídeos em oligo e polissacarídeos, podem ser hidrolisadas por ácidos ou enzimas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). No entanto, a hidrólise ácida apresenta algumas desvantagens, tais como: baixa seletividade, etapa de recuperação do ácido e neutralização, pouca flexibilidade operacional e necessidade de equipamentos altamente resistentes à corrosão (CAMILI, 2010).

Como característica principal, as enzimas apresentam uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação, diminuindo assim os custos de separação dos produtos, bem como os problemas de tratamento de efluente (SEGEL, 1975). No caso da hidrólise enzimática, a especificidade da enzima evita ainda que ocorra degradação da glicose, o que pode ocorrer na hidrólise ácida (CONTIERO, 1992). Em função disso, os processos enzimáticos vêm ganhando cada vez mais importância.

De maneira simplificada pode-se dizer que a obtenção de etanol a partir de biomassa envolve duas etapas. A primeira consiste na hidrólise dos polissacarídeos, gerando monossacarídeos e dissacarídeos. A segunda etapa envolve a fermentação dos monossacarídeos e dissacarídeos em etanol (OLSSON et al., 2002). No caso da biomassa de *lemna* como substrato, pode-se utilizar a hidrólise enzimática do amido e da celulose para obtenção de um maior teor de açúcares fermentescíveis disponíveis para a fermentação alcoólica.

2.4.1 Hidrólise enzimática do amido

O processo de hidrólise enzimática do amido acontece pelo desdobramento total de suas moléculas de amilose e amilopectina, que ao se romperem, transformam-se em dextrinas cada vez mais simples e por fim em glicose. Pelo fato das ligações glicosídicas do amido ser do tipo α (alfa), há um maior interesse na sua utilização como substrato de processos biossintéticos, já que estas ligações podem ser facilmente

hidrolisadas, quando comparadas com as do tipo β (beta), encontradas na celulose (FRANCO *et al.*, 2002b; LEONEL; CABELLO, 2001).

De forma simplificada, a hidrólise enzimática do amido é realizada em duas etapas: a liquefação e a sacarificação. No processo de liquefação, os grânulos de amido são dispersos em solução aquosa, aquecidos (causando a gomificação) e hidrolisados parcial e irreversivelmente, com auxílio de uma α -amilase (MAAREL *et al.*, 2002). A temperatura de gomificação pode variar bastante entre os amidos de diferentes fontes botânicas, oscilando na faixa de 65 a 105 °C, sendo necessário muitas vezes o emprego de altas temperaturas para a total gomificação (TORRES; LEONEL; MISCHAN, 2012).

Após a liquefação, a solução de maltodextrina, obtida da etapa anterior, é hidrolisada em glicose por uma enzima desramificante, seja endoenzima (isoamilase e pululanase) ou uma exoenzima (β -amilase e amiloglicosidase), atuando sobre as ligações glicosídicas α -1,6 da amilopectina (MAAREL *et al.*, 2002). Sendo o resultado dessa segunda etapa uma solução de sacarídeos de baixo peso molecular, como glicose e maltose.

2.4.1.1 Enzimas amilolíticas

Enzimas são compostos de natureza proteica que atuam como catalisadores biológicos em reações metabólicas energeticamente possíveis e aceleram as reações por ativação específica (CHAPLIN; BUCKE, 1990).

As enzimas amilolíticas são catalisadoras da hidrólise de ligações dos tipos α -1,4 e α -1,6, encontradas em polissacarídeos, e são denominadas como amilases (CAMILI, 2010).

Na hidrólise do amido podem ser utilizados quatro grupos de enzimas. As endo e exoamilases que agem primeiramente nas ligações α -1,4; as desramificantes que agem exclusivamente nas ligações α -1,6 e as transferases que quebram ligações glicosídicas α -1,4 e as transferem para um receptor glicosídico, formando uma nova cadeia glicosídica (CAMILI, 2010).

As amilases hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e pequenos polímeros compostos de unidades de glicose. Essas enzimas apresentam grande importância em biotecnologia com aplicações nas indústrias de alimentos, fermentação, papel e têxtil. Apesar de serem derivadas de diversas fontes, incluindo

plantas, animais e microrganismos, enzimas microbianas geralmente encontram grande demanda industrial. Atualmente grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis no comércio e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005).

São conhecidas várias enzimas que hidrolisam a molécula de amido em diferentes produtos e a ação combinada de várias enzimas é necessária para sua completa hidrólise, sendo comumente utilizado uma α -amilase associada a uma amiloglucosidase (SPIER, 2005).

A α -amilase é uma endoamilase que rompe as ligações α -1,4, ao acaso dentro da molécula de amido. (TEREBIZNIK; BUERA; PILOSO, 1998). O ataque ocorre sobre vários pontos da cadeia simultaneamente, sendo que os primeiros produtos da hidrólise são oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose (BRUCHMANN, 1990). Ao final, a α -amilase libera algumas poucas unidades de glicose, oligossacarídeos de diferentes pesos moleculares e dextrinas. Isto torna a pasta gelatinizada menos consistente e fornece maior número de terminais de cadeias para a ação das enzimas sacarificantes. Por esta razão, essa enzima é denominada de enzima liquidificante (SANTANA, 2007).

Essa enzima pode ser produzida por diversas espécies de microrganismos, mas para aplicações comerciais, a α -amilase derivada principalmente do gênero *Bacillus*, tem encontrado aplicação potencial numa variedade de processos industriais (KONSOULA; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2007; PANDEY et al., 2000). São de especial interesse para os grandes processos biotecnológicos, devido à sua estabilidade térmica notável (PRAKASH; JAISWAL, 2009).

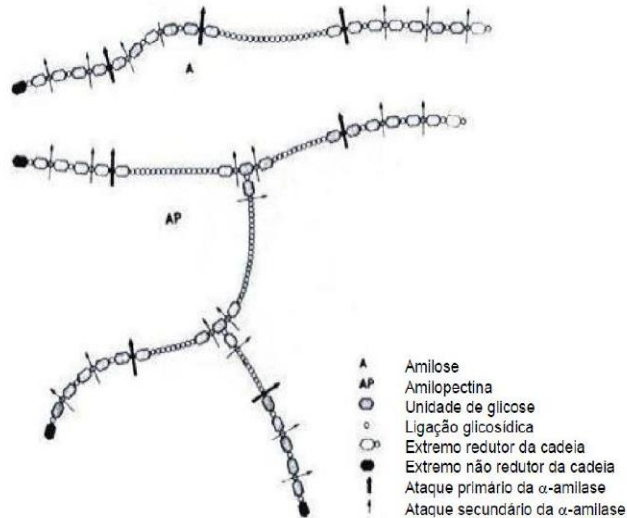
Termoestabilidade é uma característica desejável para a maior parte das enzimas industriais. Enzimas termoestáveis isoladas a partir de organismos termofílicos descobriram um número de aplicações comerciais devido à sua estabilidade. Como a etapa de liquefação do amido é realizada a altas temperaturas (100-110 °C), enzimas amilolíticas termoestáveis tem sido investigadas para melhorar os processos industriais de degradação do amido e são de grande interesse para a produção de produtos valiosos, como glicose, dextrose cristalina, dextrose, xarope de maltose e maltodextrinas (ASGHER et al., 2007).

As ligações α -1,6 da amilopectina não são hidrolisadas pela α -amilase, sendo o produto final do ataque à amilopectina, moléculas de isomaltose (Figura 4) (BRUCHMANN, 1990).

Já a amiloglucosidase, ou glicoamilase, é uma exoenzima que rompe as ligações α -1,4 e α -1,6 do amido a partir da extremidade não redutora. O resultado da sua conversão é a transformação total do amido em unidades de glicose (PANDEY et al., 2005).

As amiloglucosidasas provenientes de diferentes fontes apresentam pH ótimo entre 3,0 e 5,0 estando o pH de maior estabilidade da enzima no intervalo de 4,0 a 5,0. A temperatura ótima da enzima se encontra, na maioria das vezes, entre 50 e 60 °C (COSTA, 1996). São produzidos por um grupo diversificado de microrganismos, incluindo bactérias e fungos, no entanto as enzimas usadas comercialmente são produzidas por espécies de *Aspergillus* e *Rhizopus* (DELGADO et al., 2009).

Figura 4 - Ação da enzima α -amilase sobre as frações do amido, amilose e amilopectina.



Fonte: Bruchmann (1990).

Na hidrólise, espera-se que as α -amilases formem moléculas menores de substrato facilitando assim a ação da amiloglucosidase (CABELLO, 1995). Assim, a amiloglucosidase é utilizada em amidos liquefeitos com α -amilase para chegar a produtos que serão usados como

substratos para fermentações, ou para a obtenção biotecnológica de glicose e dextrinas (PARK; SANTI, 1977 *apud* SOUTO, 2011).

2.4.1.2 Enzimas pectinolíticas

O uso de pectinases como enzimas complementares no processo de hidrólise do amido advém como uma alternativa para aumentar o rendimento do processo (LEONEL; CEREDA, 1998).

As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pécicas, que são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular, que formam uma fina camada de material adesivo extracelular entre as paredes primárias de células de vegetais (ALMEIDA et al., 2005). Desse modo, seu uso tem o intuito de destruir a integridade estrutural da matriz responsável pelo aprisionamento dos grânulos, expondo e liberando o amido (UENOJO; PASTORES, 2007).

A habilidade para sintetizar enzimas pectinolíticas é comum entre os grupos de microrganismos, porém os fungos são os mais utilizados em escala industrial, pois cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas no meio de cultura (BLANDINO et al., 2001).

Basicamente existem três tipos de pectinases: pectina esterase (desesterificante ou desmetoxilante) que remove os grupos metil éster; as despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases) que catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécicas e as protopectinases que solubilizam protopectina para formar pectina (UENOJO; PASTORES, 2007).

2.4.2 Hidrólise enzimática da celulose

Basicamente, a biomassa celulósica é composta de cadeias de celulose (polissacarídeo formado por moléculas de glicose ligadas através de ligações β -1,4-glicosídicas) unidas entre si por ligações de hidrogênio. Essas longas fibras celulósicas são, por sua vez, recobertas por hemiceluloses (polissacarídeos ramificados formados principalmente por D-xilose com pequenas quantidades de L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, ácido glucurônico e ácido manurônico) e ligninas (redes poliméricas tridimensionais formadas por unidades fenilpropano interligadas) (WYMAN et al., 2005).

A hidrólise de celulose gera glicose e a partir daí pode gerar etanol ou outros produtos de grande interesse industrial (MACEDO,

2007). Por outro lado, a hidrólise de ligninas e hemicelulose gera açúcares e subprodutos (principalmente, difenóis, derivados de fenilpropano, cetonas, furfural e ácido acético), que muitas vezes inibem a fermentação microbiana (OGEDA; PETRI, 2010).

O processo de hidrólise da celulose catalisado por enzimas possui um rendimento baixo, principalmente devida à estrutura altamente cristalina da celulose, a qual dificulta o acesso do substrato aos sítios ativos (DADI; VARANASI; SCHALL, 2006). A dificuldade ainda é aumentada pelo fato que a celulase adsorve fisicamente sobre ligninas, o que restringe a hidrólise, pois esconde a superfície celulósica impedindo o intumescimento das fibras. Logo, torna-se necessária uma etapa de pré-tratamento, tanto a fim de quebrar a estrutura cristalina da lignocelulose quanto a fim de remover a lignina, expondo as moléculas de celulose e hemicelulose à ação enzimática.

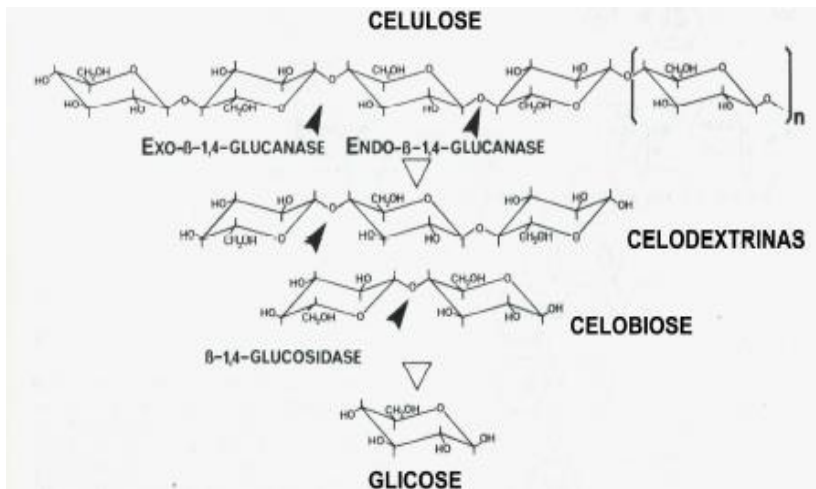
Atualmente, há uma grande quantidade de processos de pré-tratamento disponíveis, podendo ser físicos, químicos, biológicos ou de fracionamento por solvente (SOUSA, 2009). No entanto, essas tecnologias de hidrólise requerem um tratamento físico preliminar que visa eliminar as impurezas e preparar o material lignocelulósico por redução do tamanho das partículas a tratar. Essa redução de tamanho, traz como vantagem o aumento da superfície específica do material, acelerando assim, a reação de hidrólise (CARDOSO, 2008).

2.4.2.1 Enzimas celulolíticas

A hidrólise enzimática da celulose é feita usando enzimas celulolíticas. A celulase é um complexo enzimático, onde as enzimas atuam sinergicamente (OLSSON et al., 2002).

As celulases podem ser divididas em três grandes grupos: as endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica gerando oligossacarídeos menores (celodextrina e celobiose); as exoglucanases, atuam na região externa da celulose liberando unidades de celobiose e as β -glucosidases, que completam a hidrólise gerando monômeros de glicose (FENGEL; WEGENER, 1989). Suas ações podem ser vistas na Figura 5.

Figura 5 - Ação do complexo celulase na hidrólise da celulose e compostos intermediários.



Fonte: Fengel e Wegener (1989).

No mecanismo sinérgico exo-endo, as endoglucanases clivam de forma aleatória as cadeias na superfície da celulose, fornecendo assim numerosos sítios adicionais para ataque das exoglucanases. (OGEDA; PETRI, 2010). Em consequência da ação desses dois grupos de enzimas na celulose, a celobiose e a glicose são obtidas, e enquanto sua concentração no meio reacional aumenta gradualmente, as atividades dessas celulases são inibidas por esses produtos, tendo por resultado uma diminuição final na velocidade e no rendimento do processo de sacarificação. A celobiose apresenta um poder de inibição maior, sendo mais expressivo que a inibição por glicose (RABELO, 2007).

Muitos complexos de celulase disponíveis comercialmente contêm níveis baixos de β -glicosidase, conduzindo a um aumento do acúmulo de celobiose nos hidrolisados enzimáticos de celulose. Tendo a celobiose um poder inibidor mais forte do que a glicose, e sua hidrólise ocorrer através da ação das enzimas β -glicosidases, é indicado que se adicione no meio reacional uma certa quantidade dessa enzima proveniente de outras fontes de complexos enzimáticos. Dessa forma há uma diminuição da concentração de celobiose no meio reacional,

ocasionando diminuição da inibição e aumento na eficiência da hidrólise enzimática (SUN; CHENG, 2002).

2.4.2.2 Enzimas hemicelulolíticas

Hemiceluloses são classificadas de acordo com o resíduo de açúcar principal no esqueleto, como, por exemplo, xilanas, mananas e glucanas, sendo a sua remoção associada ao aumento do rendimento da hidrólise enzimática de celulose (SADDLER et al., 1982 apud OGEDA; PETRI, 2010).

Para a hidrólise de hemicelulose há enzimas específicas, as hemicelulases. São produzidas por muitas espécies de bactérias e fungos, assim como por várias plantas. Muitos micro-organismos produzem um padrão múltiplo de hemicelulases. Hoje, preparações de hemicelulases comerciais são obtidas a partir dos fungos *Trichoderma* ou *Aspergillus* geneticamente modificados (WYMAN, 2005).

2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

A demanda atual por energia é cada vez maior. A substituição das fontes utilizadas hoje, os combustíveis fósseis, gera uma procura por matérias-primas que sejam renováveis e limpas. A produção de etanol a partir de culturas agrícolas, como é o caso da cana-de-açúcar no Brasil e do milho nos EUA, causa uma competição com a produção de alimentos. Assim, há um grande interesse em explorar fontes alternativas para a produção de etanol.

Nesse cenário, a produção de etanol a partir de lemnas surge como uma matéria-prima alternativa para a produção de etanol, por reunir as características desejáveis citadas acima e aliado a isso serem cultivadas em águas residuárias, contribuindo para o tratamento desses efluentes, e possuírem a capacidade de acumular amido.

Nos EUA, estudos recentes vêm sendo realizados investigando essas plantas como uma nova tecnologia para complementar a produção de etanol à base de milho. No Brasil, até o momento, não se tem conhecimento de estudos realizados com esse fim, mesmo sendo relatadas a presença de espécies nativas no nosso país, como a espécie utilizada neste estudo (*Landoltia punctata*), cuja ocorrência foi verificada na região litorânea de Santa Catarina. Na literatura demonstrou-se que a hidrólise enzimática vem sendo empregada para a

conversão do seu conteúdo de amido em açúcares fermentescíveis e por fim em etanol. Como tentativa de potencializar a utilização da matéria-prima, também foi encontrado um trabalho demonstrando a possibilidade de hidrólise enzimática da fração de celulose, sem pré-tratamento da biomassa, devido sua característica de não possuir grandes quantidades de hemicelulose e lignina quando comparada com plantas terrestres.

Esses fatos, aliado à fundamentação teórica apresentada neste capítulo, permite justificar a realização deste trabalho, cujo maior objetivo reside na valorização biotecnológica de *Landoltia punctata* através de hidrólise enzimática das suas frações de amido e celulose, no que diz respeito a caracterizar a biomassa, definir as melhores condições de processo com o uso da ferramenta de planejamento de experimentos, a caracterização do hidrolisado obtido nas condições definidas e avaliação da capacidade da espécie em acumular amido pela privação de nutrientes, visando assim a produção de etanol.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Departamento de Engenharia Química e de Engenharia de Alimentos (EQA) e no Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU) e Laboratório de Resíduos Sólidos (LARESO), pertencente ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENS), todos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.1 MATERIAL

3.1.1 Matéria-prima

A espécie de lemnácea utilizada nos experimentos foi *Landoltia punctata*, fornecida pelo Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU), excedente de uma unidade piloto de tratamento de esgoto sanitário oriundo de condomínios residenciais. Essa unidade é constituída por três lagoas, uma com 5000 L de volume útil e as outras duas com 3500 L, todas fabricadas em fibra de vidro, instaladas nas dependências do Campus Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), na cidade de Florianópolis, junto ao Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU) e Laboratório de Resíduos Sólidos (LARESO), pertencente ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENS).

A utilização dessa espécie se deu pelo fato de apresentar eficiência na remoção de nutrientes, alta produtividade de biomassa, capacidade de acumular amido e ser nativa no estado de Santa Catarina, como afirma Mohedano (2010).

3.1.2 Enzimas

- Termamyl 2X: α -amilase termoestável, produzida através de fermentação submersa de *Bacillus licheniformis*. A enzima hidrolisa as ligações α -1,4 da amilose e da amilopectina, convertendo rapidamente o amido em dextrinas e oligossacarídeos. Possui aparência líquida, não viscosa de cor de amarelo a marrom claro e densidade aproximada de 1,26 g/mL. O pH ótimo de ação enzimática está entre 6,0 e 7,0 e a temperatura entre 90 e 105 °C (NOVOZYMES, 2007).

- Spirizyme Fuel: amiloglucosidase produzida por fermentação submersa de *Aspergillus niger*. A enzima hidrolisa as ligações α -1,4 e α -1,6 nas extremidades não-redutoras do amido liquefeito. Apresentada na forma líquida, com cor marrom escura, e densidade de aproximadamente 1,15 g/mL. Possui como condições ótimas o pH próximo a 4,5 e a temperatura em torno de 65 °C (NOVOZYMES, 2012).

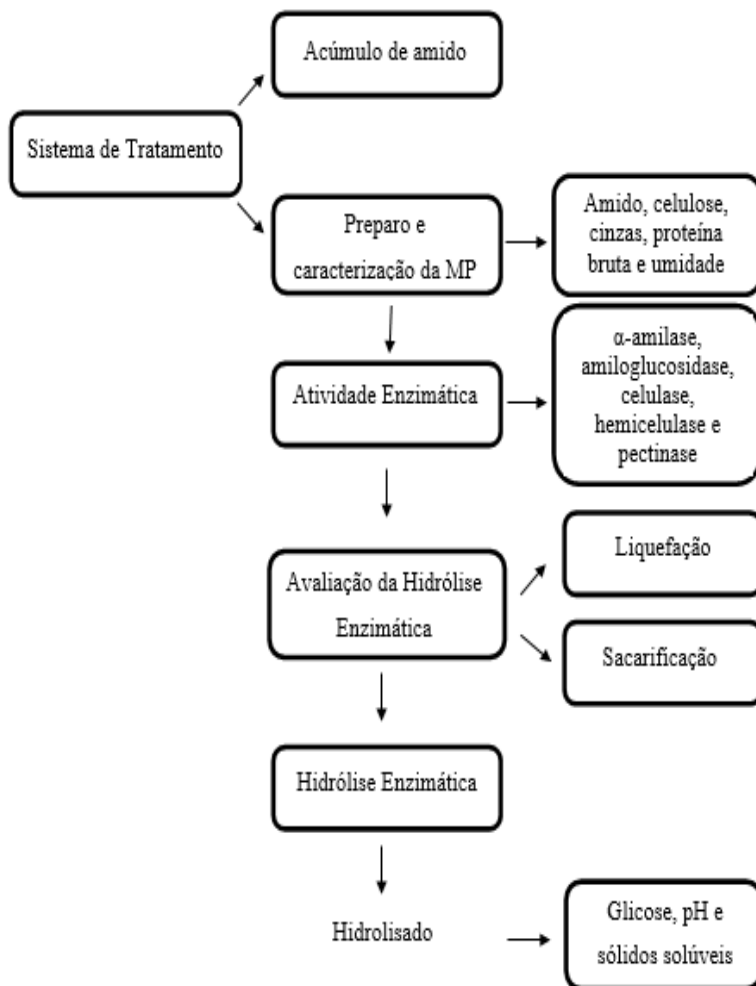
- Pectinex Ultra AFP: pectina-liase, que catalisa a clivagem de α -1,4 galacturonana formando oligossacarídeos. Produto na forma líquida, de cor marrom claro com densidade aproximada de 1.16 g/mL. A enzima possui pH ótimo de 3,0 a 4,2 e atividade de 10 a 60 °C (NOVOZYMES, 2012).

- Cellic CTec2: complexo de celulase, com elevada quantidade de β -glucosidases, para degradação de celulose em açúcares fermentescíveis. Sua temperatura e pH ideais são 45 a 50 °C e 5,0 a 5,5, respectivamente (NOVOZYMES, 2010).

- Cellic Htec2: endoxilanase com especificidade para hemicelulose. Pode melhorar a hidrólise de celulose quando combinados com CTec2. A temperatura ideal da enzima é de 45 a 50 °C e pH 5,0 (NOVOZYMES, 2010).

3.2 MÉTODOS

Um esquema geral da pesquisa é apresentado na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma geral da pesquisa.

3.2.1 Preparo e caracterização físico-química da matéria-prima

A biomassa seca (55 °C por 24 horas) foi triturada e peneirada em peneiras de 600 µm para obtenção de uma farinha de lemnas, que foi embalada em sacos plásticos, identificada e armazenada sob refrigeração, temperatura de aproximada de 7 °C, até o momento das análises (Figura 7). Essa farinha foi então caracterizada quanto ao teor de amido, celulose, cinzas, proteína bruta e umidade conforme metodologia descrita no item 3.2.5.

Figura 7 - Farinha de lemnas.



3.2.2 Determinação da atividade enzimática

Para fins de comparação, foi feita a determinação da atividade das enzimas conforme metodologia descrita a seguir e utilizando o pH e a temperatura das condições definidas neste estudo.

Além das enzimas responsáveis pela hidrólise do amido (Termamyl 2X e Spirizyme Fuel), que é o substrato de maior interesse, foi também realizada a determinação da atividade da Cellic Ctec2 (celulase), que mostrou ter efeito, através de um planejamento do tipo Plackett-Burman, sobre a hidrólise.

3.2.2.1 Enzima α -amilase (Termamyl 2X)

A determinação da atividade da enzima α -amilase foi dividida em três etapas: preparo das soluções (amido e enzima), reação e leitura da absorbância.

A solução de amido foi preparada utilizando amido solúvel P. A. (Synth) na concentração de 0,7% (m/v) e então aquecida, sem ferver, para que o amido fosse gelatinizado. A solução de enzima foi preparada a 10% (v/v), sendo aquecida por 5 min a 60 °C para homogeneização.

A reação das soluções de amostra, controle de substrato, controle de enzima e do branco, foi realizada em tubos de ensaios de vidro identificados, em triplicata, utilizando tampão acetato de sódio 0,05 M em pH 6, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Preparo da solução de reação da amostra, controle de substrato, controle de enzima e branco para atividade de α -amilase.

	Amostra (mL)	Controle de substrato CS (mL)	Controle de enzima CE (mL)	Branco (mL)
Solução de amido	0,7	0,7	-	-
Solução de enzima	0,3	-	0,3	-
Solução tampão	-	-	0,7	-
Água destilada	-	0,3	-	1,0

Os tubos foram agitados e incubados em banho-maria (Deleo) por 10 min a 60 °C e a reação foi cessada pela adição de 4 mL de ácido clorídrico (Nuclear) 0,2 M. Paralisada a reação, 0,5 mL de Fuwa foi também adicionado, agitado para homogeneização e acrescentado de 10 mL de água destilada. Em seguida, a leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 600 nm (SP 1105, Bel Photonics).

Uma unidade da atividade de α -amilase (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido por minuto. O resultado foi expresso em U/mL com base na Equação 1:

$$(U/mL) = \frac{\left(\frac{(Abs\ CS + Abs\ CE) - Abs\ A}{(Abs\ CS + Abs\ CE)} \right) \times Q_s \times f}{t \times Q_E} \quad (1)$$

Onde:

Abs CS = absorbância lida na solução de reação de controle de substrato;

Abs CE = absorbância lida na solução de reação de controle de enzima;

Abs A = absorbância lida na solução de reação da amostra;

Q_s = quantidade de amido retirada da solução para realizar a reação (mg);

t: tempo de reação em minutos;

Q_E = quantidade de enzima usada na reação (mL);

f = fator de diluição.

3.2.2.2 Enzima amiloglucosidase (Spirizyme Fuel)

A atividade enzimática da amiloglucosidase foi determinada segundo Moraes, Astol Filho e Ulhoa (1999), sendo subdivididas em três etapas: preparo de soluções (amido e enzima), reação da amostra e determinação da concentração de glicose.

A solução de amido foi preparada utilizando amido solúvel na concentração de 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 4,5). Para que ocorresse a gelatinização, a solução foi aquecida em microondas por 5 minutos para homogeneização. A solução de enzima foi preparada na concentração de 0,01% (v/v) da enzima amiloglucosidase.

A reação da amostra e do branco foi realizada em tubos de ensaios de vidro, em triplicata, segundo a Tabela 3.

Tabela 3 - Alíquotas da solução de reação da amostra e branco para análise da atividade enzimática da amiloglucosidase.

	Amostra (µL)	Branco (µL)
Solução de amido	100	100
Solução de enzima	20	-
Solução tampão	-	20

Os tubos foram agitados e incubados em banho-maria (Deleo) a 40 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada com banho de gelo.

A concentração de glicose liberada pela reação foi determinada segundo o método de glicose oxidase por meio de um kit (Glicose Liquiform, Labtest), que foi realizado segundo a Tabela 4.

Tabela 4 - Alíquotas para preparo do branco, amostra e padrão para determinação de concentração de glicose.

	Branco	Amostra	Padrão
Reagente de cor	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Solução padrão	-	-	20 µL
Solução de amostra	-	20 µL	-

Os tubos foram agitados em vórtex e incubados em banho-maria (Deleo) a 37 °C durante 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 505 nm (Bel Photonics, SP 1105). A cor é estável por 30 minutos.

Uma unidade de atividade de amiloglicosidase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por minuto a partir do amido. O resultado foi expresso em U/mL, com base nas Equações 2 e 3:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Abs Amostra}}{\text{Abs Padrão}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Atividade de amiloglicosidase (U/mL)} = \left(\frac{\text{Glicose}}{0,18 \times t} \right) \times f \times 100 \quad (3)$$

Sendo:

Abs Amostra = absorbância lida na amostra;

Abs Padrão = absorbância lida no padrão de glicose;

0,18 = massa molar da glicose (mg/µmol);

t = tempo de reação da amostra (min);

f = fator de diluição;

100 = conversão de dL para mL.

3.2.2.3 Enzima celulase (Cellic Ctec2)

A atividade da celulase foi baseada no procedimento descrito por Ghose (1987), empregando-se papel filtro como substrato e avaliando-se sua atividade pela liberação de açúcares redutores dosados pelo método de Miller (1959) empregando o ácido 3-amino-5-nitrossalicílico.

O reagente DNS foi preparado misturando-se 100 mL de solução 4% (m/v) de NaOH, 100 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio 75% (m/v) e 2,5 g de ácido 3-5-dinitrossalicílico. Por fim, completou-se o volume para 250 mL com água destilada.

A determinação envolveu quatro categorias de reações: (1) tubos das amostras a serem quantificadas (atividade enzimática); (2) tubo do branco reacional (para zerar o espectrofotômetro); (3) tubos controle da enzima (extrato enzimático sem substrato); e (4) tubos controle do substrato (substrato sem extrato enzimático). O preparo desses tubos pode ser visto na Tabela 5.

Tiras de aproximadamente 1,0 x 6,0 cm (50 mg) de papel de filtro Whatman nº1, foram enroladas em espiral e totalmente imersas nas respectivas quantidades de tampão citrato de sódio (50 mM e pH 4,8). A fase inicial da análise se deu pela incubação das reações em tubos de ensaios (triplicata) em banho-maria (Deleo) a 50 °C por 10 minutos para equilíbrio da temperatura.

Tabela 5 - Preparo das reações de amostra, branco, controle de enzima e de substrato para realização da etapa inicial da análise de determinação de atividade da celulase.

	Amostra	Branco	Controle de Enzima	Controle de Substrato
Papel filtro	1 unidade	-	-	1 unidade
Tampão	1,0 mL	1,5 mL	1,0 mL	1,5 mL

Após 10 minutos, adicionou-se 0,5 mL da enzima às reações de amostra e de controle de enzima, e todos os tubos foram incubados por 60 minutos. Ao final deste período, os tubos foram removidos e todos eles receberam as mesmas quantidades de reagentes e o mesmo tratamento, sendo 0,5 mL de cada meio reacional transferido para outro tubo, adicionado de 0,5 mL do reagente DNS e colocado em água fervente por 5 minutos. Depois desse tempo, a reação foi paralisada em

banho de gelo fundente. Ao final, adicionou-se 8 mL de solução estabilizante (tartarato de sódio e potássio 50 mM), misturou-se bem e a absorbância da solução foi medida em 540 nm. A concentração de açúcares redutores foi determinada através de uma curva de calibração onde uma solução de glicose foi utilizada como padrão (0,05 – 3,33 mg/mL).

Segundo Ghose (1987), uma unidade de atividade enzimática (U) libera 1 μmol de açúcar redutor por minuto. A partir da Equação 4 calculou-se a atividade enzimática:

$$U / mL = ART \times \frac{V_T}{0,18 \times V_E \times t} \quad (4)$$

Sendo que:

ART = açúcares redutores totais produzidos na etapa de hidrólise (mg/mL);

V_T = volume total utilizado na hidrólise (volume do tampão + volume do extrato enzimático) (mL);

0,18 = massa molar de glicose (mg/μmol);

V_E = volume do extrato enzimático utilizado na hidrólise (mL);

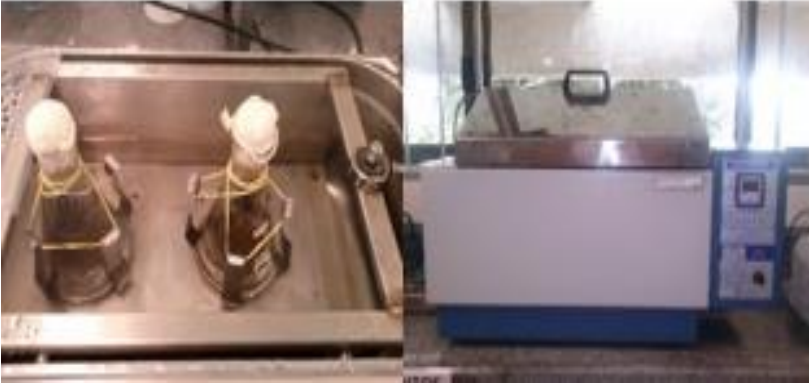
t = tempo de hidrólise (minutos).

3.2.3 Avaliação da hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática da biomassa foi dividida em duas etapas:

1. Liquefação: etapa realizada em banho-maria (Dubnoff NT 232, Nova Técnica) onde a α-amilase promove a liquefação (dextrinização) do amido produzindo maltodextrinas e oligossacarídeos pela quebra das ligações α (1-4) da amilose e amilopectina (Figura 8). Nesse estudo essa etapa foi mantida fixa, sendo utilizada a concentração da α-amilase Termamyl 2x em 0,2% (v/m, em relação a biomassa), pH 6,0, temperatura de 95 °C, agitação de 150 rpm e tempo de 2 horas, baseado nas condições ótimas da própria enzima e em literatura consultada (ABUJAMRA, 2009; TORRES, 2009; TORRES; LEONEL; MISCHAN, 2012).

Figura 8 - Banho termostatizado com agitação usado na etapa de liquefação.



2. Sacarificação: etapa em que de fato ocorre a liberação dos monômeros de glicose e que nesse trabalho foi investigada, através de planejamentos experimentais, quanto ao pH, temperatura e concentrações das enzimas utilizadas (Spirizyme Fuel, Pectinex Ultra AFP, Cellic CTec2 e Cellic Htec2) em volume de enzima por massa de biomassa seca. O tempo de sacarificação foi determinado por cinética e a agitação mantida a 150 rpm. A sacarificação foi realizada em shaker (Excella E25, New Brunswick Scientific) (Figura 9).

Figura 9 - Shaker com agitação orbital utilizado na etapa de sacarificação.



Baseado em estudos prévios (CHEN et al., 2012; XU et al., 2011; GE et al., 2012) e com a finalidade de selecionar variáveis com maiores efeitos sobre o processo de conversão do amido e celulose em glicose, foi empregado um planejamento do tipo Plackett-Burman, com 12 experimentos e triplicata no ponto central. Com a seleção das variáveis, empregou-se como teste dois planejamentos fatoriais completos 2^2 , com 4 experimentos e triplicata no ponto central, com o intuito de encontrar a melhor condição de processo (Tabela 6). Segundo Lara (2008), esse planejamento é aplicado com o interesse de determinar as variáveis experimentais e as interações entre elas que têm influência significativa sobre as diferentes respostas de interesse. A variável resposta (dependente) dos planejamentos foi a concentração de glicose (g/L) e as faixas de estudo das variáveis independentes foram escolhidas levando em consideração as condições ótimas das enzimas, as recomendações dos fabricantes e o resultado do Planejamento Plackett-Burman, no caso do fatorial completo.

As reações de hidrólise enzimática foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 500 mL pela adição de 2 g de biomassa seca em 50 mL de tampão citrato de sódio (50 mM e pH 6,0). A α -amilase foi então adicionada e a liquefação realizadas em banho-maria a 95 °C e 150 rpm por 2 horas.

Transcorrido esse tempo, os frascos foram colocados em banho de gelo para diminuição rápida da temperatura. Depois disso, e quando necessário, o pH foi corrigido com ácido clorídrico (Nuclear). Em seguida, as outras enzimas foram adicionadas, nas concentrações definidas em cada experimento, e levadas ao *skaker* a 150 rpm em temperatura definida nos níveis para cada experimento. O tempo de reação de sacarificação foi determinado por cinética, com condições fixas no ponto central do planejamento tipo Plackett-Burman, onde as amostras destrutivas para análise de glicose foram retiradas nos tempos: 0, 0,5, 1, 1,5, 2 horas e a partir daí retiradas de 2 em 2 horas até ser completado 24 horas de processo.

Tabela 6 - Faixa de estudo das variáveis independentes da matriz de planejamento para produção de glicose através de hidrólise enzimática.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
	Planejamento	Plackett	Burman
pH	3,0	4,5	6,0
Temperatura (°C)	45	55	65
Conc. Spirizyme Fuel (Amilo) (v/m)	0,1%	0,2%	0,3%
Conc. Pectinex Ultra AFP (Pect)(v/m)	0	0,05%	0,1%
Conc. Cellic Ctec2 (Cetec)(v/m)	0	3%	6%
Conc. Cellic Htec2 (Htec)(v/m)	0	0,25%	0,5%
	Fatorial	Completo	2² (I)
Temperatura (°C)	35	45	55
Conc. Cellic Ctec2 (Ctec) (v/m)	3%	6%	9%
	Fatorial	Completo	2² (II)
Temperatura (°C)	25	35	45
Conc. Cellic Ctec2 (Ctec) (v/m)	6%	12%	18%

3.2.4 Obtenção e caracterização do hidrolisado

Após determinadas as condições de sacarificação, foi realizado um estudo cinético com o intuito de definir o tempo reacional.

Com os parâmetros definidos, a hidrólise enzimática foi então conduzida e o hidrolisado obtido foi filtrado em papel filtro, armazenado em fracos âmbar de 60 mL e congelados, aproximadamente -18 °C, buscando preservar ao máximo as características originais das amostras.

O hidrolisado foi caracterizado em termos de concentração de glicose, pH e °Brix, conforme descrito no item 3.2.5.

Para a determinação da quantidade teórica de glicose produzida, foram considerados os conteúdos de amido e celulose presentes na biomassa que seriam transformados em glicose. Sabendo que as moléculas de amido e celulose apresentam a mesma composição química, através da estequiometria dessa conversão:

1 mol de glicose = 1 mol de H₂O + 1 mol de amido ou celulose, então:

180,16 g de glicose = 18 g de água + 162,16 g de amido ou celulose

Ou:

100 g de amido ou celulose teoricamente produzem 111,1 g de glicose (BRINGHENTI, 2004).

A partir do valor teórico foi calculada a eficiência da hidrólise pela Equação 5:

$$\text{Eficiência da Hidrólise (\%)} = \frac{\text{Valor real}}{\text{Valor teórico}} \times 100 \quad (5)$$

3.2.5 Análises físico-químicas

3.2.5.1 Amido

O teor de amido de *L. punctata* foi medido usando um kit de amido total (Megazyme Internacional Irlanda Co., Ltd., Wicklow, Irlanda) de acordo com as instruções do fabricante, conforme apresentado no Apêndice A. O método é baseado na conversão de amido em glicose pela combinação das enzimas α -amilase e amiloglicosidase seguida pela quantificação de glicose usando técnica colorimétrica (oxidase/peroxidase).

3.2.5.2 Celulose

O método utilizado foi o de Van Soest (1994), pela determinação da fibra em detergente ácido (FDA), onde a celulose, parte solúvel em detergente ácido, pode ser obtida por diferença de peso após colada em mufla a 500 °C.

3.2.5.3 Cinzas

As amostras foram incineradas até cor esbranquiçada e cessar a liberação de fumaça e, posteriormente, colocadas em mufla a 540 °C até peso constante (AOAC, 2012).

3.2.5.4 Glicose

A concentração de glicose foi determinada segundo o método de glicose oxidase por meio de kit (Glicose Liquiform, Labtest), conforme descrição no item 3.2.2.2.

3.2.5.5 pH

A determinação do pH foi realizada utilizando-se potenciômetro (Analion - 2000), sendo utilizados tampões de pH 4,0 e 7,0 para calibração do equipamento antes das medições. Após calibração, a medição do pH foi feita diretamente na amostra homogeneizada pela imersão do eletrodo na amostra (AOAC, 2012). Os resultados foram expressos com duas casas decimais.

3.2.5.6 Proteína bruta

Foi determinado o teor de nitrogênio por destilação em aparelho de Micro-Kjeldahl (AOAC, 2012), usando o fator 6,25 para conversão para proteínas.

3.2.5.7 Sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis foi determinado com auxílio de um refratômetro digital (ATAGO, PAL-BY/RI), onde utilizou-se 3 gotas da amostra homogeneizada. A leitura foi realizada diretamente na escala de °Brix do equipamento (AOAC 2012).

3.2.5.8 Umidade

A umidade foi determinada em estufa à 105 °C, com verificações em tempo determinados, até obtenção de peso constante, segundo a AOAC (2012). O resultado foi expresso em porcentagem.

3.2.6 Enriquecimento em amido

Baseado em trabalhos de Xu et al. (2011), cujo teor de amido obtido em *Spirodela polyrhiza* foi aumentado 64,9% através da simples transferência da biomassa de uma solução rica em nutrientes para água limpa, foram realizados experimentos também com o intuito de se enriquecer em amido a espécie estudada (*Landoltia punctata*). Esses experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU) e do Laboratório de Resíduos Sólidos (LARESO), pertencente ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENS) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

O primeiro experimento foi realizado no mês agosto de 2013, utilizando 3 caixas d'água de fibra de vidro de 100 L. Com o auxílio de um hidrômetro, foram colocados 30 L de água de torneira em cada uma das caixas. As lemnas foram retiradas do sistema de tratamento de esgoto com o auxílio de uma peneira, lavadas em água corrente e então colocadas nas caixas, que foram acondicionadas em uma estufa agrônômica por um período de 17 dias (Figura 10). Nesse período, foram retiradas 5 amostras das caixas para análise de amido.

Um segundo experimento foi realizado em novembro de 2013, sendo realizados dois tratamentos distintos, porém iniciados em conjunto: um como o anterior, com a diferença que as caixas foram acondicionadas fora da estufa e as amostras retiradas de 3 em 3 dias totalizando 9 dias de enriquecimento. O outro foi baseado em estudo feito por Tao et al. (2013). Esse enriquecimento se deu em 52 potes plásticos de 250 mL, contendo aproximadamente 50 mL de água destilada e 0,5 g de lemnas. Os potes foram acondicionados em sala equipada com ar condicionado (± 22 °C) e timer para controle do fotoperíodo de 14/10 h ciclo luz/escuro com intensidade de luz de $13,2 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Amostras foram retiradas diariamente em um período de 7 dias. O sistema montado pode ser visto na Figura 11.

Figura 10 - Transferência de biomassa para primeiro experimento de enriquecimento.



Um terceiro e último enriquecimento foi realizado em janeiro de 2014 também em potes plásticos na mesma sala com ar condicionado ($\pm 22\text{ }^{\circ}\text{C}$) utilizando o sistema de iluminação da Figura 11, com a diferença que o fotoperíodo utilizado foi de 16/8 h luz/escuro por 10 dias e que foram utilizados um total de 60 potes: 30 potes com água destilada e os outros 30 com água de torneira.

Figura 11 - Sistema de iluminação utilizado em experimento de enriquecimento com fotoperíodo controlado.



A biomassa enriquecida foi seca conforme descrito por Mohedano (2010), em estufa à 55 °C durante 24 horas, triturada, peneirada e analisada quanto ao teor de amido conforme apresentado no Apêndice A.

3.2.7 Análise estatística

Os efeitos estimados de cada variável através do erro global entre os dados experimentais e as análises de variância (ANOVA) foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (Statsoft Inc, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA

As análises para caracterização da farinha de lemnas utilizada na hidrólise estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Composição da farinha de lemnas em base seca.

Componente	% (p/p)
Umidade	6,07 ± 0,18
Amido	6,53 ± 0,21
Celulose	12,83 ± 0,05
Proteína Bruta	34,27 ± 0,11
Cinzas	10,54 ± 0,16

A avaliação do teor de umidade da farinha de lemnas tem grande importância, em razão da influência desse na conservação de suas propriedades, tendo em vista que níveis maiores que 13% podem proporcionar crescimento microbiano e deterioração em curto tempo. Assim o valor de umidade obtido de 6,07 % encontra-se abaixo desse limite mostrando ser favorável a uma maior estabilidade do material.

O teor de amido encontrado foi de 6,53% (p/p base seca), quantidade ainda maior que o obtido por Tao et al. (2013), que foi de 3,0% (p/p base seca), e bem menor do que os 24,59% (p/p base seca) encontrados por Chen et al. (2012), ambos para a mesma espécie.

A quantidade de amido está relacionada com as condições de crescimento, como afirma Reid e Bielecki (1970) *apud* Chen et al. (2012), que em estudos indicaram que *L. punctata* pode ter um teor de 3 a 75%, demonstrando o potencial dessa espécie em acumular amido.

De modo geral, em condições que otimizam o crescimento (rico em nutrientes), a biomassa tem um percentual relativamente baixo de amido, visto que para sua reprodução a energia é adquirida por meio da fotossíntese, que é também necessária para o armazenamento de amido, fazendo com que o acúmulo de amido concorra com o crescimento por energia (XIAO et al., 2013). Assim, a baixa quantidade de amido (6,53%) pode ser atribuída ao fato de terem sido cultivadas em efluente doméstico, rico em nutrientes.

Uma vez que condições ideais de crescimento e acúmulo são diferentes, uma etapa adicional seria necessária para produção de biomassa com elevado conteúdo de amido, como a manipulação das condições de seu cultivo (XU et al., 2011). Em aplicações práticas, a escassez de nutrientes é atualmente o caminho economicamente mais viável de se promover o enriquecimento em grande escala (XU et al., 2012).

Neste trabalho foram realizados experimentos em escala laboratorial para acúmulo de amido, cujos resultados são apresentados no item 4.5. No entanto, devido à necessidade de uma grande quantidade de matéria-prima para condução dos experimentos e ao tempo hábil, não foi possível trabalhar com a biomassa enriquecida.

A celulose apresentou valor médio de 12,83% (p/p base seca), valor este próximo aos 13,31% (p/p base seca) encontrado por Chen et al. (2012) também em *L. punctata* e em conformidade com Ge et al. (2012), que afirmam que lemnáceas têm conteúdos relativamente baixos de celulose (aproximadamente 10% em peso seco) em comparação com plantas terrestres (aproximadamente 50% em peso seco) e que em seu estudo com *Lemna minor* encontrou 9,4% (p/p base seca).

À semelhança de outros componentes da biomassa, o teor de celulose depende da espécie, sendo responsável por dar a rigidez e firmeza às plantas, permitindo-as ficar na posição vertical. No entanto, essas plantas são aquáticas e pequenas, consideradas as menores plantas vasculares do mundo, sendo então justificável esse valor de celulose encontrado (JOURNEY; SKILLICORN; SPIRA, 1993).

O valor de proteína bruta obtido foi de 34,27% (p/p base seca). São encontrados diversos dados sobre o teor de proteína na biomassa de lemnáceas, os quais variam entre 6,8 – 45,0% (LANDOLT; KANDELER, 1987). Em estudo com *L. punctata* em dejetos suíno no Estado de Santa Catarina, Mohedano (2010) encontrou um teor de 35% (p/p base seca), já Chen et al. (2012) obtiveram 16,27% (p/p base seca) em condições naturais de crescimento e Tao et al. (2013) encontraram um valor 29,6% (p/p base seca) em solução nutritiva padrão.

Essas diferenças encontradas são decorrentes da disponibilidade de nitrogênio no meio que, segundo Landolt e Kandeler (1987), é o principal fator que afeta a produção de proteína, pois este é utilizado na formação de aminoácidos e conseqüentemente de proteínas, sendo então esperado que em águas com maior quantidade de nitrogênio seja também maior o teor de proteínas.

Neste estudo, o elevado teor de proteínas (34,27%) foi associado ao nível relativamente baixo de amido (6,07%) o que corrobora com o teor de proteína da biomassa de lemnáceas estar correlacionada negativamente com o de amido (CUI et al., 2011; XU et al., 2011). Segundo Ge et al. (2012), a fração proteica obtida em seu estudo com *Lemna minor* (32,3% p/p base seca) constituiu uma fonte de nitrogênio adequada para a fermentação, não havendo necessidade de complementação com substâncias nitrogenadas, o que poderia ajudar a reduzir o custo total de produção de etanol. Em todos os processos industriais em que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* participa os meios de cultura devem conter necessariamente uma fonte de nitrogênio, além de uma fonte de carbono, sais minerais e vitaminas (COOPER, 1994).

O teor de cinzas determina o conteúdo de elementos minerais presente na amostra. Foi encontrado um teor de 10,54% (p/p base seca), valor esse superior ao encontrado por Chen et al. (2012) que foi de 3,48% (p/p base seca). Segundo Ge et al. (2012) um elevado teor de cinzas indica uma excelente capacidade de recuperação mineral do meio, que em seu estudo com *Lemna minor* obteve 17,7% (p/p base seca). Essa diferença deve-se às particularidades entre as espécies e à disponibilidade desses nutrientes no ambiente aquático. Khan, Steingass e Drochner (2002) relataram quantidades elevadas de Ca, P, Na, K, Fe, Mn, Mg, Cu e Zn nos tecidos dessas plantas.

4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para fins de comparação dos valores das atividades enzimáticas, foi feita a análise das atividades das enzimas responsáveis pela hidrólise do amido, α -amilase (Termamyl 2X) e amiloglucosidade (Spirizyme Fuel), e da celulase (Cellic Ctec2).

As determinações dessas atividades foram realizadas conforme item 3.2.2, sendo que a diferença entre a atividade 1 e 2 estão nos valores de pH e temperatura, já que para a atividade 1 foram utilizados os da referida metodologia e para a atividade 2 foram utilizadas o da condição definida para hidrólise, sendo que para a α -amilase foi pH 6,0 e temperatura de 95 °C, e para a amiloglucosidase e celulase foi também pH 6,0 e temperatura de 45 °C. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Atividade enzimática da α -amilase, amiloglicosidase e celulase.

Atividade (U/mL)	α-amilase*	Amiloglicosidase*	Celulase*
Atividade 1	824,56 \pm 6,93 ^a	617,21 \pm 7,28 ^a	44,31 \pm 5,07 ^a
Atividade 2	819,23 \pm 6,10 ^a	590,53 \pm 6,64 ^a	38,53 \pm 2,22 ^a

U= unidade de atividade enzimática

*Letras iguais nas colunas significam que as amostras não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Apesar das tentativas de padronização internacional, a atividade enzimática é específica de cada fabricante. As enzimas também possuem diferentes exigências quanto a temperaturas e pH, dificultando a comparação das atividades a partir das fichas técnicas dos produtos e com dados de outros estudos. Além disso, a variedade de metodologias e adaptações elevam o grau de dificuldade de comparação dos resultados.

Os valores das atividades obtidas, apresentados na Tabela 8, não apresentaram diferença significativa ($p \geq 0,05$) pelo teste de Tukey, quando comparadas com as condições de processo definidas para a hidrólise. Esse fato é de suma importância principalmente para a sacarificação, onde a amiloglicosidase e a celulase, com condições ótimas distintas, foram adicionadas em uma única etapa. Assim, o pH e a temperatura utilizadas não tiveram influência negativa sobre a atividade das enzimas mesmo trabalhando fora de suas condições ótimas, como é o caso principalmente da amiloglicosidase.

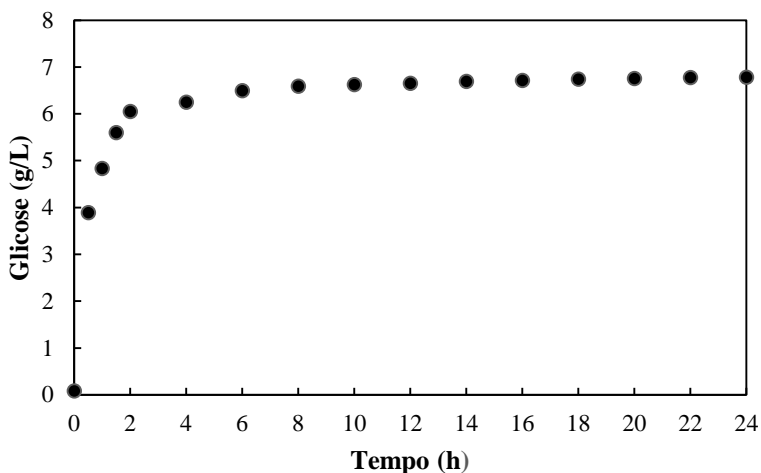
4.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A relação utilizada de lemnas (g) por volume de tampão (mL) foi estabelecida através de teste nas proporções de 1:25, 1:50 e 1:100, visto que na concentração de 1:10 foi observado dificuldade de agitação do meio.

O teste foi realizado em frascos Enlermeyer de 500 mL por 2 horas para observação da agitação do meio e a melhor relação encontrada foi de 1:25, visto que em proporção maior de biomassa o banho-maria utilizado não realizava uma boa agitação e homogeneização e em proporções menores a concentração de glicose obtida diminuía.

A fim de definir o tempo de reação a ser utilizada nos planejamentos experimentais para a etapa de sacarificação, foi realizada uma cinética prévia durante 24 horas, após etapa de liquefação, que foi definido como tempo 0. As condições de sacarificação foram fixadas no ponto central do planejamento Plackett-Burman (Tabela 6). As mostras destrutivas para se determinar a concentração de glicose foram retiradas em 0, 0,5, 1, 1,5, 2 horas e a partir daí retiradas a cada 2 horas até um total de 24 horas (Figura 12).

Figura 12 - Cinética prévia para determinação do tempo de sacarificação.



Os resultados obtidos nessas condições mostraram que a concentração de glicose aumentou significativamente até as 2 horas (6,05 g/L), apresentando depois uma tendência a estabilizar, obtendo ao final do experimento, com 24 horas, uma concentração de 6,78 g/L (aumento de 12%), sendo então o tempo de reação de 2 horas definido com o tempo de reação de sacarificação e utilizado como fixo nas etapas seguintes.

Com essas condições definidas, um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman, com 12 ensaios e triplicata no ponto central, foi realizado para a etapa de sacarificação com o intuito de avaliar o efeito do pH, temperatura e concentração das enzimas Spirizyme Fuel

(amilo), Pectinex Ultra AFP (pect), Cellic CTec2 (Ctec) e Cellic Htec2 (Htec) sobre a concentração de glicose. A etapa de liquefação, com α -amilase 0,2% (v/m, em relação a biomassa), pH 6,0, temperatura de 95 °C e tempo de 2 horas, agitação e tempo de sacarificação (150 rpm e 2 horas, respectivamente), foram mantidos constantes em todos os experimentos. A Tabela 9 apresenta a matriz do planejamento de experimentos com os valores reais e codificados e as respostas em termos de concentração de glicose.

A partir da Tabela 9 pode-se verificar que valores maiores de concentrações de glicose foram obtidos nos ensaios 8 (6,17 g/L), 9 (5,85 g/L), 10 (5,84 g/L) e no ponto central do planejamento (ensaios 13, 14 e 15) com um valor médio de concentração de glicose de 5,89 g/L \pm 0,25, sendo que nos três primeiros ensaios citados o ponto em comum foi a utilização da menor temperatura (45 °C) e a maior concentração da enzima Cellic Ctec2 (6%).

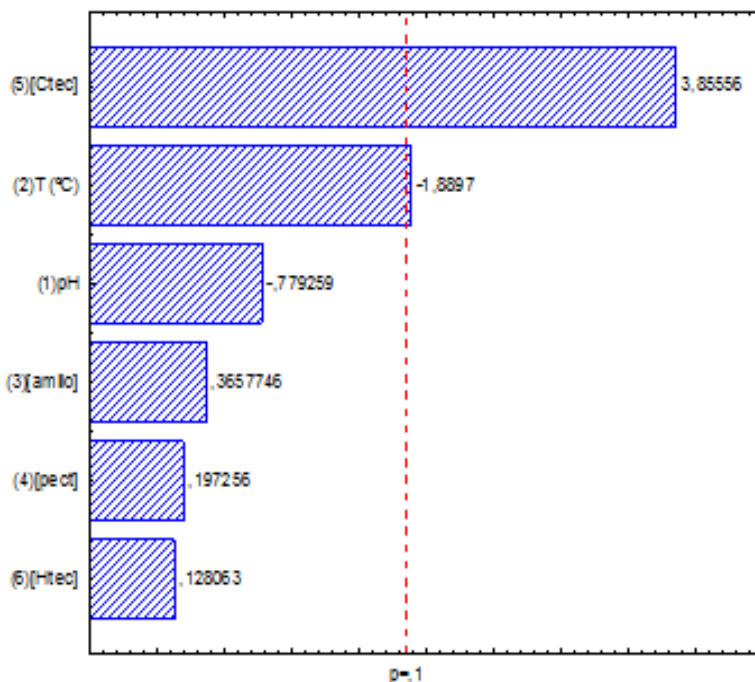
Tabela 9 - Matriz do planejamento de experimentos Plackett-Burman (valores reais e codificados) com resposta em termos de concentração de glicose.

Ens	pH	Temp (°C)	Amilo (%v/m)	Pect (%v/m)	Ctec (%v/m)	Htec (%v/m)	Glic (g/L)
1	6,0 (1)	45(-1)	0,3 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	2,92
2	6,0 (1)	65 (1)	0,1 (-1)	0,1 (1)	0 (-1)	0 (-1)	2,95
3	3,0(-1)	65 (1)	0,3 (1)	0 (-1)	6 (1)	0 (-1)	5,16
4	6,0 (1)	45(-1)	0,3 (1)	0,1 (1)	0 (-1)	0,5 (1)	3,83
5	6,0 (1)	65 (1)	0,1 (-1)	0,1 (1)	6 (1)	0 (-1)	4,29
6	6,0 (1)	65 (1)	0,3 (1)	0 (-1)	6 (1)	0,5 (1)	4,55
7	3,0(-1)	65 (1)	0,3 (1)	0,1 (1)	0 (-1)	0,5 (1)	3,12
8	3,0(-1)	45(-1)	0,3 (1)	0,1 (1)	6 (1)	0 (-1)	6,17
9	3,0(-1)	45(-1)	0,1 (-1)	0,1 (1)	6 (1)	0,5 (1)	5,85
10	6,0 (1)	45(-1)	0,1 (-1)	0 (-1)	6 (1)	0,5 (1)	5,84
11	3,0(-1)	65 (1)	0,1 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,5 (1)	3,31
12	3,0(-1)	45(-1)	0,1 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	3,49
13	4,5 (0)	55 (0)	0,2 (0)	0,05 (0)	3 (0)	0,25 (0)	6,06
14	4,5 (0)	55 (0)	0,2 (0)	0,05 (0)	3 (0)	0,25 (0)	5,60
15	4,5 (0)	55 (0)	0,2 (0)	0,05 (0)	3 (0)	0,25 (0)	6,00

Os dados apresentados na Tabela 9 foram tratados estatisticamente e os principais efeitos das variáveis são apresentados no Diagrama de Pareto (Figura 13), onde se pode observar que a

concentração de Cellic Ctec2 e a temperatura apresentaram efeito significativo ($p < 0,1$) sobre a concentração de glicose. O efeito da Ctec (% v/m) mostrou-se positivo indicando que a elevação desse nível proporciona aumento da liberação de glicose. Já o efeito da variável temperatura ($^{\circ}\text{C}$) foi negativo, assim a sua diminuição favorece a elevação de glicose.

Figura 13 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito das variáveis na concentração de glicose ($p < 0,1$).



Valor Estimado (Valor Absoluto)

De acordo com a Figura 13, o pH, a concentração de Spirizyme Fuel (amilo), Pectinex Ultra AFP (pect) e Cellic Htec2 (Htec) não apresentaram efeito significativo sobre a produção de glicose. Assim, a concentração mínima (0,1% v/m) de Spirizyme Fuel (amilo) foi utilizada como fixa na hidrólise em conjunto com a Termamyl 2X (α -

amilase), utilizada na etapa de liquefação, por serem as responsáveis pela hidrólise do amido. Esses resultados podem ser considerados relevantes, principalmente quando não demonstrada a necessidade de utilização de todas as enzimas estudadas, o que tornariam o processo mais oneroso. Além disso, o processo pode ser facilitado e ter seu custo diminuído pela não necessidade de correção do pH, possibilitando trabalhar com um pH único em toda a reação.

As enzimas complementares estudadas, Pectinex Ultra AFP e Cellic Htec2, foram utilizadas como alternativa para aumentar a produção de glicose. As pectinases têm sido empregadas como auxiliar na hidrólise do amido por agir sobre a rede fibrosa da parede celular, que mantém seus grânulos presos, de forma a expor e liberar o amido (UENOJO; PASTORE, 2007). A Cellic Htec2 (hemicelulase) foi utilizada em conjunto com a Cellic Ctec2 por poder melhorar a hidrólise de celulose quando combinadas (NOVOZYMES, 2010).

Chen et al. (2012) utilizaram pectinase como auxiliar na hidrólise do amido (associada à α -amilase e amiloglicosidase), visando aumentar a liberação de glicose e assim melhorar a produção de etanol a partir de *L. punctata*. As condições (dose de pectinase, temperatura e tempo) foram otimizadas e, em experimento de validação, um aumento de 142% na produção de glicose foi obtido em comparação com os que não utilizaram a enzima, sendo ainda observado alterações ultra-estruturais de aumento de porosidade na rede fibrosa que envolvia os grânulos de amido. No trabalho em questão, o amido era o principal polissacarídeo na matéria-prima, (24,59% em base seca) quantidade bem maior que a obtida nesse estudo (6,53% em base seca), o que pode justificar a não necessidade do seu uso.

Em estudo realizado por Ge et al. (2012), a hidrólise enzimática de ambas as frações de amido (10,3% p/p base seca) e celulose (9,4% p/p base seca) de *Lemna minor* foram investigadas e foi detectada a falta de lignina e a deficiência em hemicelulose, e obteve-se aproximadamente 10 g/L de glicose liberadas a partir dessas frações. Para *Landoltia punctata*, a mesma espécie utilizada neste estudo, uma pequena quantidade de lignina (5,55% base seca) foi encontrada (CHEN et al., 2012). Esses fatos corroboram com o efeito da Cellic Ctec2, sem a necessidade da Cellic Htec2, por tornar a biomassa menos recalcitrante a sacarificação, possibilitando à hidrólise da celulose mesmo sem pré-tratamento.

Após a determinação das variáveis significativas realizou-se um planejamento fatorial 2^2 , com 4 experimentos e triplicata no ponto central, a fim de verificar a influência das variáveis concentração de Cellic Ctec2 e temperatura sobre a produção de glicose. A concentração de amiloglucosidase (0,1% v/m), o pH (6,0) e o tempo de 2 horas foram mantidos constantes. A Tabela 10 apresenta a matriz desse planejamento de experimentos.

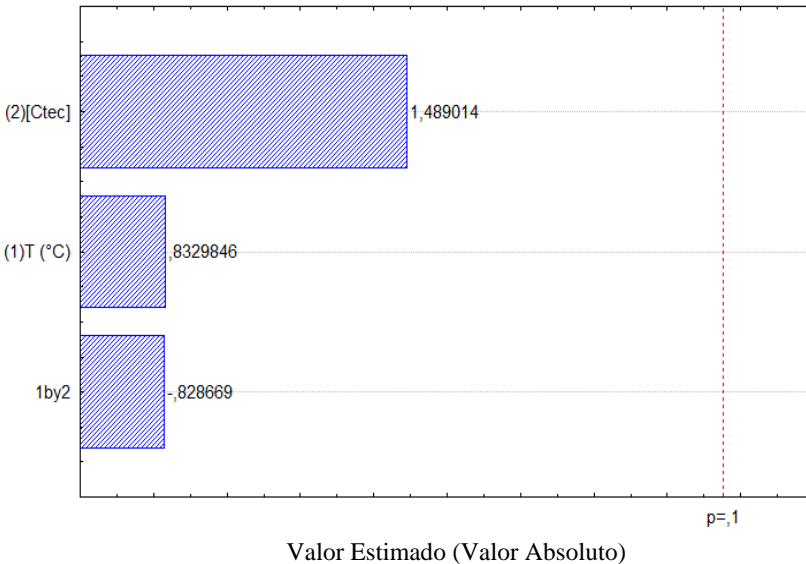
Tabela 10 - Matriz do planejamento de experimentos fatorial (valores reais e codificados) com resposta em termos de concentração de glicose.

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração Ctec (% v/m)	Glicose (g/L)
1	35 (-1)	3 (-1)	3,47
2	55 (1)	3 (-1)	4,80
3	35 (-1)	9 (1)	5,32
4	55 (1)	9 (1)	5,33
5	45 (0)	6 (0)	5,72
6	45 (0)	6 (0)	5,74
7	45 (0)	6 (0)	5,89

De acordo com a Tabela 10, as concentrações de glicose mais elevadas foram obtidas no ponto central do planejamento, ensaios 5, 6 e 7, tendo valor médio de glicose de $5,78 \text{ g/L} \pm 0,06$, com valores próximos aos encontrados no 3 (5,32 g/L) e no 4 (5,33 g/L). Esses maiores valores de concentração de glicose no ponto central podem ser atribuídos à temperatura empregada (45 °C), que é ótima para a enzima, e os ensaios 3 e 4 a maior quantidade de enzima utilizada. Os resultados da Tabela 10, foram tratados estatisticamente e apresentados na Figura 14.

O diagrama é uma forma de se avaliar visualmente a influência dos fatores estudados na resposta. Observando a Figura 13, a temperatura, a concentração de Cellic Ctec2, com níveis de 35, 45 e 55 °C e 3, 6 e 9% (v/m), respectivamente, não apresentaram efeito significativo ($p < 0,1$) sobre a concentração de glicose. Esse fato pode ser atribuído principalmente às temperaturas utilizadas serem próximas à ótima da enzima (45-50°C), que foi utilizada como ponto central do planejamento, fazendo com que nesses níveis de enzima desempenhos semelhantes fossem obtidos.

Figura 14 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito da temperatura e da concentração de Cellic Ctec2 na produção de glicose ($p < 0,1$). Os dados experimentais estão indicados na Tabela 10.



Desse modo, um novo planejamento, também fatorial 2^2 com 4 experimentos e triplicata no ponto central, foi realizado. Os níveis utilizados foram definidos procurando utilizar valores diferentes dos utilizados no anterior e baseados no planejamento tipo Plackett-Burman, onde através do Diagrama de Pareto (Figura 12) a Ctec mostrou ter efeito positivo indicando que a elevação dos seus níveis proporcionaria aumento da liberação de glicose e a temperatura com efeito negativo de forma inversa. Assim, nesse novo experimento, a concentração mínima de enzima (6% v/m) foi a máxima utilizada no Plackett-Burman. A temperatura (45 °C) que havia sido a mínima do Plackett-Burmann aqui foi utilizada como máxima, levando em conta que nos planejamentos anteriores esteve associada as maiores concentrações de glicose obtidas.

A Tabela 11 apresenta a matriz desse planejamento de experimentos com valores reais e codificados e a resposta em concentração de glicose. Foram mantidos fixos, assim como no anterior, o tempo de reação (2 horas), concentração de amiloglucosidase (0,1% v/m) e pH (6,0).

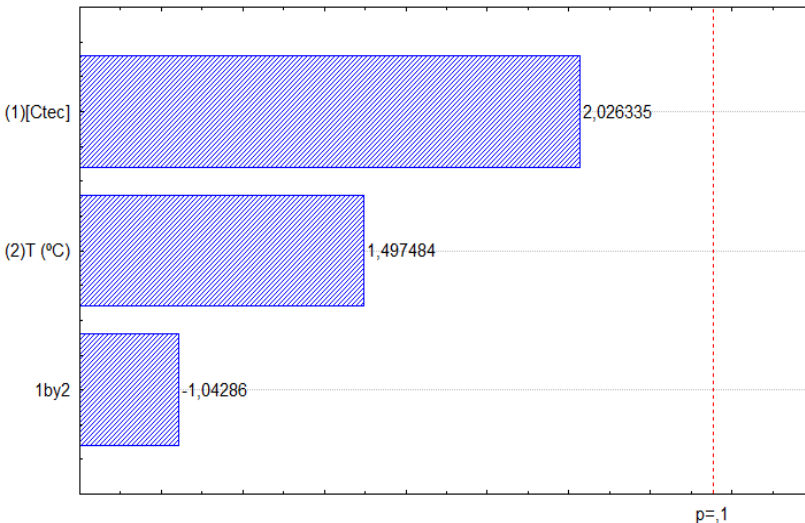
Tabela 11 - Matriz do segundo planejamento de experimentos fatorial (valores reais e codificados) com as respostas em termos de concentração de glicose.

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração Ctec (% v/m)	Glicose (g/L)
1	25 (-1)	6 (-1)	2,89
2	45 (1)	6 (-1)	5,75
3	25 (-1)	18 (1)	5,26
4	45 (1)	18 (1)	6,17
5	35 (0)	12 (0)	6,23
6	35 (0)	12 (0)	6,09
7	35 (0)	12 (0)	6,28

Pela Tabela 11, pode-se verificar que as maiores quantidades de glicose liberadas foram no ponto central do planejamento (ensaios 5, 6 e 7), com um valor médio de $6,20 \text{ g/L} \pm 0,10$, valor similar ao obtido no ensaio 4 (6,17 g/L), seguido do ensaio 2 (5,75 g/L), onde nesses últimos a temperatura empregada foi de 45 °C. Os resultados da Tabela 11, foram tratados estatisticamente e a Figura 15 demonstra os efeitos das variáveis sobre a concentração de glicose.

Observando a Figura 15, mesmo com as mudanças de níveis, não houve efeito significativo ($p < 0,1$) da temperatura e concentração de Cellic Ctec2 sobre a produção de glicose

Figura 15 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito das variáveis temperatura e concentração de Cellic Ctec2 sobre a produção de glicose ($p < 0,1$) com os dados experimentais da Tabela 11.



Valor Estimado (Valor Absoluto)

Em todos os experimentos utilizados, uma faixa de temperatura de 25 a 65 °C e de concentração de Ctec de 0 a 18% foram utilizadas. No planejamento tipo Plackett-Burman, onde essas variáveis foram selecionadas, o efeito da temperatura mostrou-se negativo, indicando assim que a diminuição do seu nível favorecia a liberação de glicose, e que a concentração de Cellic Ctec2, com efeito positivo, tivesse seus níveis aumentados. Esses resultados tornam-se justificáveis pela menor temperatura utilizada (45 °C) ser ótima para a enzima e sua maior concentração favorecer o aumento da concentração do produto. Essas premissas foram então utilizadas em dois planejamentos fatoriais, e no entanto, não foi possível se identificar o efeito significativo dessas variáveis sobre a produção de glicose.

Esses resultados indicam que a enzima pode funcionar de forma eficiente mesmo não estando em suas condições ideais de temperatura

(45-50 °C) e pH (5,0-5,5), visto que pelos planejamentos fatoriais, fora dessas condições, o desempenho das enzimas foi semelhante, não sendo possível diferenciá-los estatisticamente ($p < 0,1$), o que é muito vantajoso do ponto de vista de processo, por ter maior flexibilidade operacional.

Devido ao fato de não ter sido possível se obter uma condição otimizada de hidrólise e procurando se obter condições de sacarificação, a temperatura de sacarificação foi fixada em 45 °C, por ser a temperatura ótima da enzima Cellic Ctec2 que demonstrou ter efeito significativo ($p < 0,1$) sobre a produção de glicose, no planejamento tipo Plackett-Burman. Além disso, nos planejamentos fatoriais essa temperatura estar associada aos maiores valores de glicose obtidos.

Com isso, foram realizados experimentos em triplicata com quatro diferentes concentrações de Cellic Ctec (2, 6, 18 e 30%) baseados em dosagens sugeridas na ficha da enzima (NOVOZYMES, 2010). Foram mantidas constantes a temperatura (45 °C), pH (6,0), concentração de amiloglucosidase (0,1% v/m) e agitação (150 rpm) por um tempo de 2 horas. Os valores médios de glicose podem ser vistos na Tabela 12.

Tabela 12 - Efeito das diferentes concentrações de Cellic Ctec2 sobre a concentração de glicose.

Ctec (% v/m)	Glicose (g/L)*
2	4,76 ± 0,17 ^a
6	5,95 ± 0,09 ^b
18	6,24 ± 0,08 ^b
30	6,84 ± 0,20 ^c

*Letras iguais nas colunas significam que as amostras não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

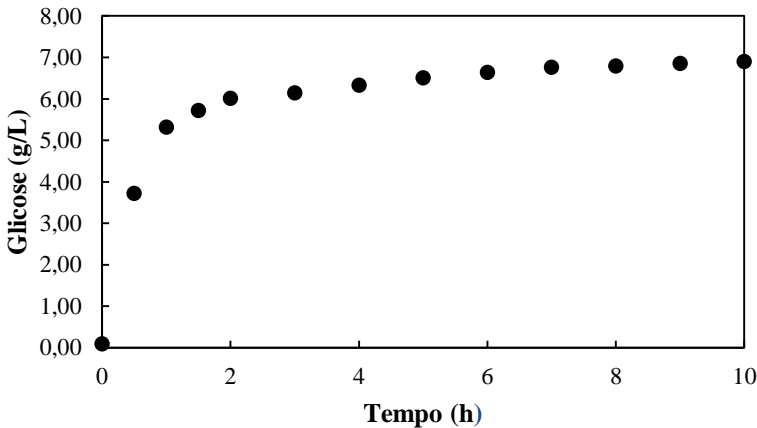
Pela Tabela 12, como esperado, o aumento da concentração de enzima provocou o aumento também de glicose, tendo o menor valor obtido com 2% de Ctec (4,76 g/L) e o maior com 30% de Ctec (6,84 g/L). Os experimentos a 6 e 18% de Ctec (5,95 e 6,24 g/L, respectivamente) não diferiram significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Comparando os experimentos com 2% (4,76 g/L) e 6% de Ctec (5,95 g/L), houve um incremento de 25% sobre o valor de glicose, e os com 6% e 30% (6,84 g/L) de Ctec, houve um incremento de 15%, no entanto uma quantidade de enzima 5

vezes maior foi utilizada, o que aumentaria consideravelmente o custo de produção. Assim, a concentração de Cellic Ctec foi definida em 6%.

Desse modo, as condições de sacarificação definidas foram: temperatura de 45° C, pH 6,0, concentração de 0,1% (v/m) de Spirizyme Fuel, concentração de 6% de Cellic Ctec2 e agitação de 150 rpm.

Com essa definição, foi então realizada uma cinética final para determinar o tempo de sacarificação, mantendo-se fixas as condições descritas acima. Amostras destrutivas foram retiradas no tempo 0, 0,5, 1, 1,5, 2 horas, e depois de hora em hora até um total de 10 horas. Os resultados podem ser vistos na Figura 16.

Figura 16 - Cinética final para determinação do tempo de sacarificação.



De acordo com a Figura 16, até o tempo de 2 horas foi observado um aumento significativo da concentração de glicose, com valor de 6,01 g/L. A partir desse ponto os resultados tiveram um incremento médio de 2,4% entre os pontos de 3 a 7 horas, com 6,15 e 6,76 g/L respectivamente, e a partir daí o conteúdo de glicose foram próximos, sendo obtido com 10 horas 6,90 g/L de glicose. Devido aos incrementos a partir das 2 horas terem sido pequenos e um menor tempo de processo ser desejável economicamente, o tempo de 2 horas foi definido como o tempo de reação de sacarificação.

Então, de forma a sintetizar, as condições de hidrólise definidas foram:

- Liquefação: temperatura de 95 °C, pH 6,0, concentração de 0,2% (v/m) de Termamyl 2x (α -amilase), velocidade de agitação de 150 rpm e tempo de 2 horas. Etapa essa mantida fixa em todos os experimentos.
- Sacarificação: temperatura de 45 °C, pH 6,0, concentração de 0,1% (v/m) de Spirizyme Fuel (amilo) e concentração de 6% de Cellic Ctec2, agitação de 150 rpm e tempo de 2 horas. Etapa essa que foi investigada neste trabalho.

4.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO HIDROLISADO

Com as condições de hidrólise definidas, foi produzido o hidrolisado, em três repetições, e as análises físico-químicas para sua caracterização em triplicata. Os resultados médios estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores médios para os parâmetros glicose, pH e sólidos solúveis do hidrolisado.

Parâmetros	Resultados
Glicose (g/L)	6,02 \pm 0,20
pH	5,94 \pm 0,005
Sólidos solúveis (°Brix)	3,57 \pm 0,06

A concentração de glicose obtida (6,02 g/L), foi bem próximo ao obtido no estudo cinético de determinação do tempo de sacarificação, que em 2 horas obteve-se 6,01 g/L, confirmando essa concentração encontrada.

Considerando que a biomassa apresentava 6,53% de amido e 12,83% de celulose, uma suspensão de 2 g biomassa em 50 mL de tampão, contendo somados 0,39 g de amido e celulose, produziria 0,43 g de glicose. Esse é o valor teórico obtido pelas relações estequiométricas apresentadas no item 3.2.4. No entanto, o valor real obtido foi de 0,30 g de glicose, obtendo assim (pela Equação 5) uma eficiência de hidrólise de 69,77%.

Ge et al. (2012) também hidrolisaram as frações de amido (10,3% base seca) e celulose (9,4% base seca) de *Lemna minor* e obteve aproximadamente 10 g/L de glicose, representando 96,2% do total de glicose que podia ser liberado, uma quantidade bem maior que o obtido nesse estudo.

Essa menor concentração de glicose obtida pode ser atribuída às condições definidas para a hidrólise não serem as otimizadas, onde se obteria valores maximizados de glicose, ou a uma menor conversão da fração de celulose em glicose, que é de mais difícil hidrólise enzimática. Em seu estudo, Ge et al. (2012), não detectaram lignina e hemicelulose em sua biomassa, o que facilita a degradação da celulose e explica a quantidade de glicose liberada (96,2% do total). Sendo necessários estudos adicionais de otimização de hidrólise para que uma maior eficiência seja alcançada.

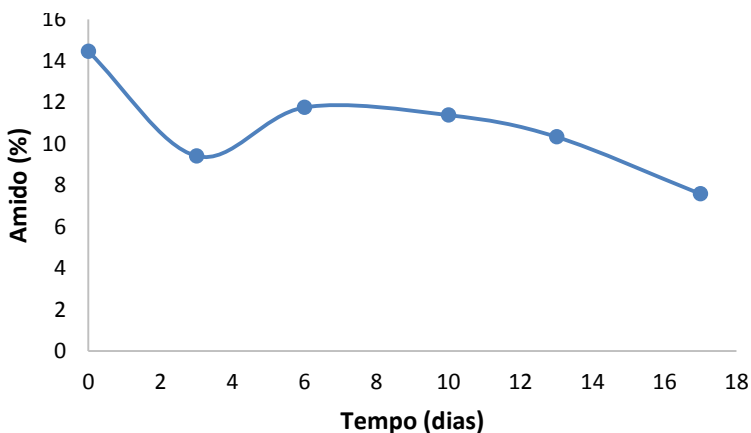
O pH (5,94) manteve-se praticamente inalterado durante a hidrólise enzimática, mostrando que o tampão utilizado para o ajuste do pH em 6,0, no início do processo, foi eficiente.

O teor de sólidos solúveis encontrado foi 3,57 °Brix, valor este que era esperado ser baixo pois a maior parte dos sólidos solúveis são açúcares e uma concentração baixa de glicose foi obtida. A análise de sólidos solúveis possibilita o preparo do produto a ser fermentado, ajustando a quantidade de substrato presente no mosto às condições de fermentação.

4.5 ENRIQUECIMENTO EM AMIDO

Como sugerido por Xu et al. (2012) o conteúdo de amido em lemnáceas, pode ser elevado pela transferência da biomassa de uma água rica em nutrientes para água limpa. O primeiro experimento foi realizado em três caixas d'água, capacidade de 100 L, com 30 L de água de torneira cada, que foram acondicionadas em estufa por 17 dias. O resultado obtido nesta etapa é apresentado na Figura 17.

Figura 17 - Teor de amido em função do tempo após transferência das lemnas para água sem nutrientes.



De acordo com Xu et al. (2012), a escassez de nutrientes é atualmente o meio mais economicamente viável para enriquecer lemnáceas em amido em grande escala, por ser reconhecido que a deficiência de nitrogênio tem um efeito de retardamento no seu crescimento vegetativo, o que consequentemente pode provocar acúmulo de amido.

A biomassa colhida tinha inicialmente 14,45% (p/p base seca) de amido e ao contrário do esperado não houve acúmulo, sendo que no terceiro dia esse valor caiu para 9,41% (p/p base seca) e no sexto dia foi obtido o maior valor (11,45% p/p base seca), durante o experimento. No entanto, não foi superior ao conteúdo inicial.

Em estudo de enriquecimento com *Spirodela oligorrhiza* realizado por Xu et al. (2011), a biomassa crescida em efluentes da suinocultura (18,8% de amido, base seca) foi transferida para água limpa e após 8 dias foi obtido 29,8% (base seca) de amido. Segundo os autores, a temperatura da água durante o período de acumulação de amido, maior e menor foram, respectivamente, 24,2 e 14,8 °C. Diminuíram 3,6 e 7,4 °C, respectivamente, em comparação com aqueles durante o período de produção de biomassa, respectivamente, sendo essa diminuição na temperatura favorável ao enriquecimento.

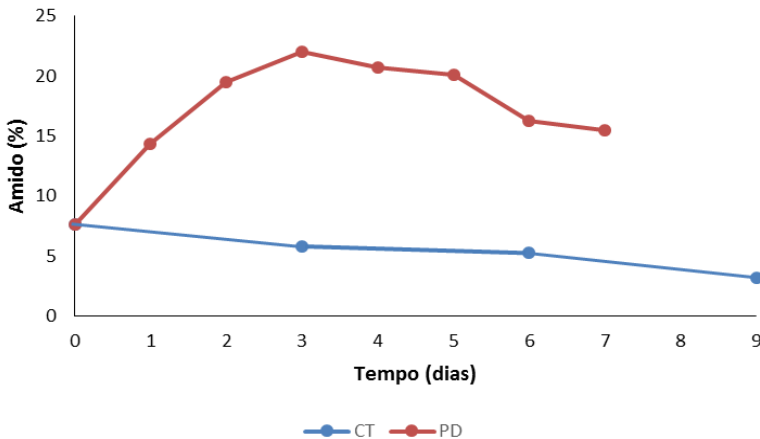
Durante a realização do experimento, que ocorreu no mês de agosto, a temperatura mínima da água registrada foi 18 °C e a máxima

28 °C. No entanto, dentro da estufa onde as caixas foram acondicionadas, a temperatura máxima chegou a 43 °C, sendo atribuída, principalmente, à alta temperatura o prejuízo ao enriquecimento. Embora as menores temperaturas possam afetar negativamente a produção de biomassa, ela favoreceria o acúmulo de amido por reduzir a respiração das plantas a noite quando o consumo de amido é substancial (XU et al., 2011).

Com isso, um segundo experimento foi realizado com a caixa com água de torneira fora da estufa por 9 dias e um, em conjunto, baseado no estudo de Tao et al. (2013), pela transferência da biomassa para água destilada, sendo essa acondicionada em sala equipada com iluminação de fotoperíodo de 14/10 h ciclo luz/escuro, intensidade de luz de 13,2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, e ar condicionado com temperatura em torno de 22 °C por 7 dias. A Figura 18 apresenta os resultados obtidos.

A biomassa utilizada em ambos os experimentos continham a mesma quantidade inicial de amido (7,62% p/p base seca).

Figura 18 - Teor de amido em função do tempo em experimentos de escassez de nutrientes.



CT = caixa d'água com água de torneira;
PD = potes com água destilada.

A exemplo do ocorrido no experimento anterior, não houve enriquecimento em amido nas caixas d'água com água de torneira. Esses experimentos foram conduzidos em novembro e temperaturas altas da água e similares ao experimento anterior foram observadas, mesmo com as caixas fora da estufa, com máxima de 28 °C e a mínima de 22 °C, sendo a mínima 4 °C maior que a do primeiro experimento. Assim, ao invés de acúmulo de amido houve o seu consumo, provavelmente pelo aumento da respiração provocado por essas maiores temperaturas. Além disso, uma quantidade inferior de amido inicial, quase a metade do anterior, foi encontrada inicialmente. Essa quantidade também pode ser associada à temperatura, pois no mês de agosto as temperaturas foram mais amenas que no mês de novembro, sendo então esperado um maior teor de amido. As altas temperaturas relatadas no primeiro experimento aconteceram dentro da estufa, onde a biomassa para enriquecimento foi acondicionada, e o cultivo das lemnas foi realizada ao ar livre.

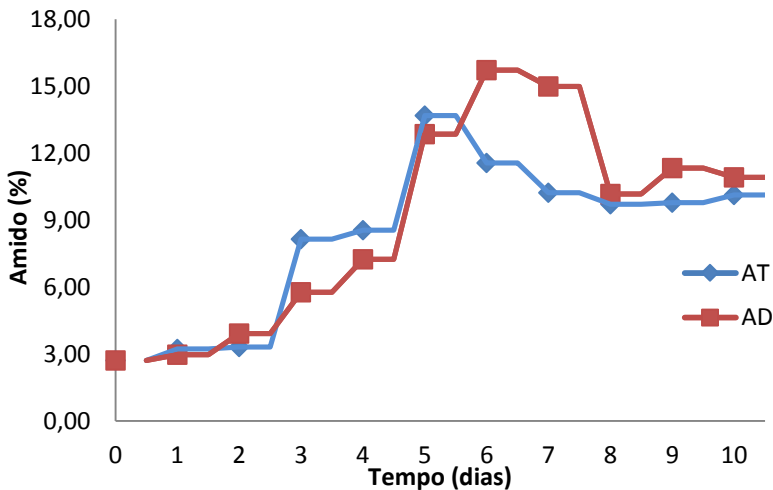
No experimento com água destilada, onde as lemnáceas foram acondicionadas em sala com ar condicionado e fotoperíodo de 14/10 h (luz/escuro), já no terceiro dia de enriquecimento a biomassa atingiu seu valor máximo (22,01% p/p base seca), um aumento de 188,84%. Tao et al., (2013) também estudaram o acúmulo de amido também em *Landoltia punctata* em água destilada, onde a biomassa continha inicialmente 3,0% (p/p base seca) de amido e em 24h de escassez de nutriente a quantidade foi de 18,3% (p/p base seca) chegando a 45,8% (p/p base seca) em 7 dias sob fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro). Segundo esses autores, em supressão dos nutrientes essenciais, a planta redirecionou o fluxo metabólico para fixação de dióxido de carbono na forma de amido, resultando em seu acúmulo. Essa maior quantidade de amido encontrada pode ser atribuída ao maior fotoperíodo utilizado e maior intensidade de luz (130 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) que favorece a fotossíntese, além das temperaturas mais amenas de 25 °C/15 °C (dia/noite) que diminui a respiração da planta e assim o consumo de amido acumulado na fotossíntese.

O acúmulo de carboidratos, como o amido, é uma das estratégias que permitem à espécie sobreviver em condições adversas que ocorrem em seu ambiente natural, possibilitando-a um maior arranque de crescimento após estresse (LIMA, 1996 *apud* QUITÉRIO, ALMEIDA e FILHO, 2009).

Para verificar se a água destilada foi determinante para o acúmulo de amido, foi realizado em janeiro, simultaneamente, um terceiro e

último experimento em água destilada e em água de torneira (Figura 19). O estudo foi realizado na mesma condição do experimento em água destilada anterior, sendo aumentado o fotoperíodo (16/8 h luz/escuro).

Figura 19 - Acúmulo de amido em biomassa transferida para água de torneira e para água destilada.



AT = água de torneira;

AD = água destilada.

Conforme apresentado na Figura 19, a biomassa continha inicialmente 2,71% (p/p base seca) de amido, a menor quantidade de amido obtida neste estudo, que coincidiu com a época mais quente, em comparação com os meses de agosto e novembro. Os maiores valores de amido obtidos foram: para água de torneira 13,68% (p/p base seca), em 5 dias, e para a água destilada 15,73% (p/p base seca), em 6 dias. A pequena diferença obtida demonstrou que a água destilada não foi o fator isolado determinante para o acúmulo de amido. O que é de grande vantagem, visto que seu custo é bem maior. Além disso, a água de torneira apresentou seu maior valor em um menor intervalo de tempo.

Segundo Xiao et al. (2013), as temperaturas baixas levam a redução do crescimento da biomassa e favorecem o acúmulo de amido, fato esse observado nesse experimento, já que a biomassa era mantida em sala refrigerada a $\pm 22^{\circ}\text{C}$. De acordo com esses autores, a energia necessária para o armazenamento de amido é adquirida a partir da fotossíntese, de modo que a acumulação de amido concorre com o crescimento por essa energia. Assim, pode-se obter lemnáceas com quantidade maior de amido suprimindo o crescimento da planta por qualquer meio que tenha pouco efeito sobre a sua fotossíntese, como a privação de nutrientes.

Além do fator temperatura, o maior fotoperíodo utilizado (16/8 h ciclo luz/escuro) mostrou ter influência positiva sobre o acúmulo, já que a fotossíntese pode ser melhorada aumentando a disponibilidade de luz (XU et al., 2012). Fato este que corrobora com o aumento de amido ter sido maior nesse experimento (cerca de 5 vezes o valor inicial) do que o anterior (cerca de 3 vezes o valor inicial).

Em seu estudo com água destilada, Tao et al. (2013) obtiverem em 7 dias de enriquecimento 45,8% de amido (p/p base seca), valor este aproximadamente 3 vezes maior ao encontrado neste trabalho (15,73% p/p base seca), em 6 dias. Esse menor valor de amido deve-se a menor intensidade de luz utilizada nesse experimento ($13,2 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) quando comparada ao utilizado por Tao et al. (2013), que foi de $130 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, pois ao aumentar a intensidade luminosa a fotossíntese também aumenta e sob a condição de escassez de nutriente acumula amido.

Como evidenciado, a acumulação de amido após a produção das lemnas se faz necessário, já que condições ideais de crescimento normalmente não resultam em elevado teor de amido e a maior quantidade de amido ser um dos critérios mais importantes para determinar o potencial dessas plantas como matéria-prima para a produção de etanol. Estudos adicionais sobre os fatores que podem maximizar o conteúdo de amido em grande escala e que não gere custos elevados que venham a tirar sua competitividade são necessários.

5 CONCLUSÕES

A caracterização da biomassa mostrou o conteúdo de amido (6,53%), sendo esse baixo teor devido aos nutrientes do efluente utilizado para sua produção, que favorecem seu crescimento e desfavorecem o acúmulo de amido.

Com o auxílio de planejamentos experimentais foram definidas as condições de sacarificação em pH 6,0, temperatura de 45 °C, concentração de Spirizyme Fuel e Cellic Ctec2 em 0,1 e 6% (v/m), respectivamente. O tempo de reação foi determinado cineticamente em 2 horas, onde o hidrolisado obtido nessas condições apresentou pH de 5,94, concentração de glicose de 6,02 g/L e 3,52 °Brix.

Um aumento considerável no conteúdo de amido (5 vezes o seu valor inicial) foi observado em *Landoltia punctata* em experimento de enriquecimento pela privação de nutrientes. Sendo assim, uma etapa de enriquecimento após sua produção faz-se necessária, visto que suas condições de crescimento são diferentes das necessária para se obter uma maior quantidade de amido.

As frações de amido e celulose da biomassa mostraram-se ser de fácil hidrólise enzimática, que associada ao fato de crescerem em superfícies de águas residuais, não competindo assim com terras produtíveis e nem com alimentos, tornam-se uma matéria-prima potencial para produção de etanol.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo como base os resultados obtidos e com o intuito de dar continuidade e complementar o estudo realizado, apresenta-se as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- Avaliar outros níveis que não utilizados nos planejamentos de experimentos a fim de se obter uma condição otimizada;
- Estudar os efeitos de variáveis que têm influência no acúmulo de amido para se obter uma biomassa com maiores teores;
- Realizar o enriquecimento em amido em maior escala para se realizar o estudo com biomassa enriquecida;
- Estudar o processo fermentativo para avaliar o rendimento de etanol produzido.

7 REFERÊNCIAS

ABUJAMRA, L. B. Produção de destilado alcoólico a partir de mosto fermentado de batata-doce. 2009. 156f. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade De Ciências Agronômicas, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu. 2009.

ALMEIDA, C.; BRÁNYIK, T.; MORADAS-FERREIRA, P.; TEIXEIRA, J. Continuous production of pectinase by immobilized yeast cells on spent grains. *Process Biochem.*, 40, 21. 2005.

A.O.A.C. Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of the Association of the Agricultural Chemists. 19 ed. v.2, Arlington, 2012.

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, v. 3, n. 4. 2010.

ASGHER, M.; ASAD, M.J.; RAHMAN, S.U.; LEGGE, R.L. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *J Food Process Eng* 79, 950 - 955. 2007

BAI, F.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.* 26, 89–105. 2008.

BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13:25-58, 1994.

BELLUCO, A. E. S. Alterações fisiológicas e de composição em *Saccharomyces cerevisiae* sob condições não proliferantes. 2001. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

BERGMANN, B. A.; CHENG, J.; CLASSEN, J.; STOMP, A.M.. Nutrient removal from swine lagoon effluent by Duckweed. *Transactions of the ASAE*42(2): 263-269p. 2000.

BLANDINO, A.; DRAVILLAS, K.; CANTERO, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. ; Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. *Process Biochem.* 37, 497. 2001.

BONOMO, L.; PASTORELLI, G.; ZAMBON, N. Advantages and limitations of duckweed-based wastewater treatment systems. *Water Science and Technology* 35 (5), 239-246. 1997.

BRINGHENTI, L. Qualidades do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca. Botucatu, 2004. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2004.

BRUCHMANN, E. Bioquímica técnica. Zaragoza: Acribia Espanha, 1990. 233 p.

CABELLO, C. Identificação de parâmetros para monitoramento de processo contínuo de hidrólise enzimática, na produção de glicose a partir de fécula de mandioca. 1995. 208 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1995.

CAMILI, E. A. Parâmetros operacionais do processo de produção de etanol a partir de polpa de mandioca. 2010. 148 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de esquita Filho”, Botucatu, 2010.

CARDOSO, V. M. Aplicação da radiação de feixe de elétrons como pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar para hidrólise enzimática de celulose. São Paulo. USP (2008). Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de tecnologia Nuclear). Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C. Enzyme Technology. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 280 p

CHEN, Q.; JIN, Y.; ZHANG, G.; FANG, Y.; XIAO, Y.; ZHAO, H. Improving production of bioethanol from duckweed (*Landoltia punctata*) by pectinase pretreatment. *energies*, 5, 3019-3032. 2012.

CHENG J. J.; BERGMAN, B. A.; CLASSEN, J. J.; STOMP. A. M.; HOWARD, J. W., Nutrient recovery from swine lagoon water by *Spirodela punctata*. *Bioresource Technology* (81) 81-85, 2002.

CHENG, J. J.; STOMP A. M. Growing duckweed to recover nutrients from wastewaters and for production of fuel ethanol and animal feed. *CLEAN – Soil, Air, Water*. 37 (1): 17–26, 2009.

CONTIERO, J. Estudo da produção da enzima invertase extracelular por *Kluyveromyces bulgaricus*. Campinas: UNICAMP, 1992. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1992.

COOPER, T. G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: STRATHERN, J. N., JONES, E. W., BROACH, J. R. The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: metabolism and gene expression. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

COSTA, J. A. V. Estudo da produção de amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz. 1996. 203 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

CUI, W. H.; XU, J. L.; CHENG, J.J.; STOMP, A. M. Starch accumulation in duckweed for bioethanol production. *Biol Eng*, 3:187–197. 2011

CULLEY, D. D.; MYERS, R. W. Effect of harvest rate on duckweeds yield and nutrient extraction dairy waste lagoon. 1978.

DADI, A. P.; VARANASI, S.; SCHALL, C. A. Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. *Biotechnol. Bioeng.* 95, 904. 2006.

DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Química de Alimentos de Fennema. 4ª edição. São Paulo: Artmed Editora S. A. 2010.

DELGADO, R.; CASTRO, A. J.; VÁZQUEZ, M.; A kinetic assesment of enzymatic hydrolysis of potato (*Solanum tuberosum*). *Food Science and Technology*, Vol 42, 797 – 804, 2009.

DEMIRBAS, A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Convers. Manage.* 49 (8), p. 2106–2116, 2008.

FENGEL, D.; WEGENER, WOOD, G. Chemistry, Ultrastructure, Reactions. New York, Walter de Gruyter, Inc., 1989.

FRANÇA, G. M. O.; FILHO, J. F. M.; PEREIRA, C. M.; FARIA, G. A.; MELO, F. V. S. T.; SANTOS, J. G. Valor nutricional de *Lemna valdiviana* Phil (Araceae) submetida a diferentes concentrações de fertilização com excremento de aves. *Revista Biotemas.* p. 19-26, 2009.

FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO L. J. C. B.; LEONEL M.; CEREDA M. P.; VILPOUX O. F.; SARMENTO, S. B. S. Introdução. In: CEREDA, M. P. (Coord.). *Propriedades gerais do amido (Série: Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas)*. São Paulo: Fundação Cargill, 2002.v. 1, cap. 1, p. 13-21

GE, X.; ZHANG, N.; PHILLIPS, G. C.; XU, J. Growing *Lemna minor* in agricultural wastewater and converting the duckweed biomass to etanol. *Bioresource Technology* 124, 485–488. 2012

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry.* 59: 257-268. 1987.

GIJZEN, H. & KHONDKER M. An overview of the ecology, physiology, cultivation and application of duckweed, literature review. Report of Duckweed research Project, Dhaka, Bangladesh. 1997.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective. Process Biochemistry, London, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.

HAMMOUDA, O., GABER, A.; ADBEL-HAMMED M.S. Assessment of the effectiveness of treatment of waste-water-contaminated aquatic systems with *Lemnagibba*. *Enz. Microb. Tech.* 17, 317-323.1995.

HASAN, M. S.; EDWARDS, P. Evaluation of duckweed (*Lemna perpusilla* and *S. polyrrhisa*) as feed for Nile tilapia (*O. niloticus*). *Aquaculture* 104: 315 – 126p. 1992.

IQBAL, S. Duckweed aquaculture. Potentials, possibilities and limitations, for combined wastewater treatment and animal feed production in developing countries. Switzerland. SANDEC report n.6 91pp. mar. 1999.

ISLAM, K. M. S. Feasibility of duckweed as poultry feed: A review. Bangladesh, Indian. *Journal of Animal Sciences* 72 (6): 486-491p. 2002.

JANE, J.; KASEMSUWAN, T.; LEAS, S.; IA, A.; ZOBEL, H.; ROBYT, J.F. (1994). Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy. *Starch/Stark*, 46, 322-345

JOURNEY, W.; SKILLICORN, P. W.; SPIRA, W. Duckweed aquaculture. A new aquatic farming system for developing countries. World Bank Publication. 67pp. Washington, D.C. 1993.

KHAN, M.J.; STEINGASS H.; DROCHNER, W. Evaluation of some aquatic plants from Bangladesh through mineral composition, in vitro gas production and in situ degradation measurements. *Asian – Australian journal of animal Science.* 15 (4): 537-542p.2002.

KONSOULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Co-production of alpha-amylase and beta-galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresour Technol* 98, 150-157. 2007

KÖRNER, S.; VERMAAT, J.E.; VEENSTRA, S. The capacity of duckweed to treat wastewater: Ecological considerations for a sound design. *J. Environ. Qual.* 2003, 32, 1583–1590.

LANDESMAN, L.; PARKER, N. C.; FEDLER, C. B.; KONIKOFF, M. Modeling duckweed growth in wastewater treatment systems. *Livestock Research for Rural Development*, 17. 2005

LANDOLT, E. Biosystematic Investigation on the Family of Duckweeds: The Family of Lemnaceae. A Monograph Study; Veroffenteichungendes Geobotanischen Institutes der Eidg. Techn. Hochschule, (ETH): Zurich, Switzerland. p. 38. 1986

LANDOLT, E., KANDELER, R. The family of Lemnaceae - a monographic study: phytochemistry, physiology, application, bibliography. Biosystematic investigation the family of duckweeds. Veroffenteichungendes Geobotanischen Institutes der Eidg. Techn. Hochschule, (ETH): Zurich, Switzerland. v.4, n.95, 638 p. 1987.

LARA, P.C.P. Aplicação de métodos quimiométricos na análise direta de constituintes inorgânicos em leite materno por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. 2008. 123f. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

LEHNINGER, A. L; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. São Paulo: Sarvier, 2006. 4 ed. 1232 p.

LEONEL, M.; CABELLO, C. Hidrólise enzimática do farelo de mandioca: glicose e álcool. In: CEREDA, M.P. (Coord.). Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação Cargill., v. 4, cap. 22, p. 280-290. (Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas). 2001.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; Avaliação da celulase e pectinase como enzimas complementares, no processo de hidrólise-sacarificação do farelo de mandioca para produção de etanol. Botucatu-SP, 1998.

LIMA, P.C. Acúmulo e distribuição de matéria seca, carboidratos e macronutrientes em mudas de *Eucalyptus* spp em solos com diferentes potenciais hídricos. 1996.106p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1996.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher, 2002. v. 3. 593 p.

LOPES, J. J. C. Metabolismo de carboidratos pelas leveduras.2006. 22 slides, color.

MACEDO, I. C. Situação Atual e Perspectivas do Etanol, Estudos Avançados, v. 21, n. 59, p. 157-165, Janeiro. 2007.

MAAREL, M. J. E. C.; VEEN, B.; UITHDEHAAG, J. C. M.; LEEMHIU, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and Applications of Starch-converting Enzymes of the α -amylase family. Journal of Biotechnology, v.94, p.137-155, 2002.

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

MOHEDANO, R. A. Tratamento de efluente e produção de alimento, em cultivos de tilápias (*Oreochromis niloticus*), através da macrófita aquática *Lemna valdiviana* (lemnaceae). - Uma contribuição para a sustentabilidade da aquicultura. 2004. 44 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MOHEDANO, R. A. Uso de macrófitas Lemnáceas (*Landoltia punctata*) no polimento e valorização do efluente de suinocultura e na fixação de carbono. Florianópolis: UFSC, 2010. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

MORAES, L. M. P.; ASTOL FILHO, S.; ULHOA, C. J. Purification and some properties of an α -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology e Biotechnology*, Haia, v. 15, p. 561-564, 1999.

MURADOV, N.; FIDALGO, B.; GUJAR, A. C.; T-RASSI, A. Pyrolysis of fast-growing aquatic biomass – *Lemna minor* (duckweed): Characterization of pyrolysis products. *Bioresource Technology* 101, p. 8424–8428, 2010.

NOVOZYMES. Cellic® CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials. Disponível em: <<http://www.scienceplease.com/files/products/overviews/cellicctec2.pdf>> Acesso em: 08 nov. 2013.

NOVOZYMES. Pectinex® Ultra AFP. Disponível em: <<http://catalog.gusmerenterprises.com/Asset/PectinexUltraAFPPDS.pdf>> Acesso em: 08 nov. 2013.

NOVOZYMES. Spirizyme® Fuel – The industry standard for saccharifications. Disponível em: <<http://bioenergy.webkreation.dk/files/documents/SpirizymeFuelbenefisheet.pdf>> Acesso em: 08 nov. 2013

NOVOZYMES. Termamyl® 2X. Disponível em: <http://www.lnf.com.br/downloads/termamyl_2x.pdf> Acesso em: 08 fev. 2013.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. *Quím. Nova*. 33, n 7, 1549-1558, 2010.

OLSSON, L.; JØRGENSEN, H.; KROGH, K. B. R.; ROCA, S. Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. ed. 42. 2002.

ORON, G.; PORATH D.; JANSEN, H. Performance of duckweed species *Lemna gibba* on municipal waste'water for effluent renovation

and protein production. *Biotechnology & Bioengineering* 29 (2), 258-268. 1987.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem* 31 (Pt 2), 135-152. 2000.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. *Enzyme Technology*. Berlin: Springer Us, 2005. 742 p

PARK, Y. K.; SANTI, M. S. S. Induction of high amyloglucosidase producing mutant from *Aspergillus awamori*. *Journal of Fermentation Technology*, Osaka, v. 55, p. 193-195, 1977.

POTT, V. J. *Plantas Aquáticas do Pantanal*. Corumbá -MS. Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal. Embrapa, 404pp 2000.

PRAKASH, O.; JAISWAL, N. Alpha-Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009.

QUITÉRIO, G. C. M.; ALMEIDA, T. I. R.; FILHO, C. R. S. Caracterização espectral de *Brachiaria brizantha* cultivada em solo contaminado por hidrocarbonetos como instrumento de detecção de vazamentos em dutos. *Anais XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Natal, Brasil, p. 5381-5388. 2009.

RABELO, S. C. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Campinas: UNICAMP (2007). Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Químicos). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2007.

REID, M. S.; BIELESKI, R. L. Response of Spirodela-oligorhiza-M to Phosphorus Deficiency, *Plant Physiol.* (Rockville) , 46 (4), 609 – 613, 1970

RIBEIRO, F. J.; LOPES, J. J. C.; FERRARI, S. E. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, v. 105, n. 1, p. 26-30, 1987.

SADDLER, J. N.; BROWNELL, H. H.; CLERMONT, L. P.; LEVITIN, N. Enzymic hydrolysis of cellulose and various pretreated wood fractions. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 1982.

SANCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from diferente feedstocks. *Bioresour. Technol.* 2008, 99, 5270–5295.

SANTANA, N. B. Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento de fermentação alcóolica para produção de etanol. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2007.

SEGEL, I. H. Cap I: Enzymes as biological catalyts. *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems.* Nem York: John Wiley, 1975, p 1-17.

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

SOUSA, L. C.; CHUNDAWAT, S. P. S.; BALAN, V.; DALE, B. E.; *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 339. 2009

SOUTO, L. R. F. Utilização de casca de mandioca na produção de vinagre: características físico-químicas e funcionanis. Goiânia. UFG (2011). Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, 2011.

SPIER, M. R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido. 2005. 178f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

SUN, Y.; CHENG, J.; Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresource Technology*, v. 83, 1-11. 2002.

TAO, X.; FANG, Y.; XIAO, Y.; JIN, Y.; MA, X.; ZHAO, Y.; HE, K.; ZHAO, H.; WANG, H. Comparative transcriptome analysis to investigate the high starch accumulation of duckweed (*Landoltia punctata*) under nutrient starvation. *Biotechnology for Biofuels*, 6:72. 2013.

TAVARES, F. A. Reúso de água e polimento de efluentes de lagoas de estabilização por meio de cultivo consorciado de plantas da família lemnaceae e tilápias. 2008. 235 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2008.

TEREBIZNIK, M. R.; BUERA, M. P.; PILOSOFF, A. M. R. Thermostability and browning development of fungal α -amylase freeze-dried in carbohydrate and PVP matrices. *Food Science and Technology* 31, 143–149. 1998

TÍMAR-BALÁZSY, A.; EASTOP, D. Chemical principles of textile conservation. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1998.

TORRES, L. M.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. *Ciência Rural*, Santa Maria. 2012.

TORRES, L. M. Caracterização dos parâmetros técnicos do processo de fabricação de aguardente a partir de gengibre. 2009. 120f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Campus de Botucatu, São Paulo. 2009.

TORRES, L. M.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. *Ciência Rural*, Santa Maria. 2012

TRIPATHI, B. D.; SHUKLA S. C. Biological treatment of wastewater by selected aquatic plants. *Environmental Pollution*, 69: p.69-78. 1991.

UENOJO, M.; PASTORE, M. G. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 388-394, 2007.

VAN SOEST, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*. New York, 1994, 476 p.

VÁSQUEZ, M. P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA Jr., M.B.; PEREIRA Jr., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 137-140, issues 12. 2007.

WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIIKARI, L. *Em Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*; Dumitriu, S., ed.; Dekker: New York, 2005, cap. 43.

XU, J.; CUI W.; CHENG, J. J.; STOMP A, M. Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol. *Biosystems Engineering* 110, 67-72. 2011.

XU, J.; SHEN, G. Growing duckweed in swine wastewater for nutrient recovery and biomass production. *Bioresour. Technol.* 102 (2), 848–853. 2011.

XU, J.; ZHAO, H.; STOMP, A. M.; CHENG, J. J. The production of duckweed as a source of biofuels. *Biofuels* 3(5), 589-201. 2012.

XIAO, Y.; FANGA, Y. JIN, Y.; ZHANG. G.; ZHAO, H. Culturing duckweed in the field for starch accumulation. *Industrial Crops and Products* 48. 183– 190. 2013.

ZHAO, H.; APPENROTH, K.; LANDESMAN, L.; SALMEAN, A. A.; LAM, E. Duckweed rising at Chengdu: summary of the 1st International Conference on Duckweed Application and Research. *Plant Mol Biol*, 78:627–632. 2012.

8 APÊNDICE A – ANÁLISE DE AMIDO

Neste apêndice é apresentado o método de determinação de amido utilizando um kit de amido total (Megazyme Internacional Irlanda Co., Ltd., Wicklow, Irlanda) de acordo com as instruções do fabricante.

Reagentes

- Kit de amido Megazyme, que contém: frasco 1 com α -amilase termoestável (10 mL), frasco 2 com amiloglucosidade (10 mL), frasco 3 com reagente para tampão GOPOD (48 mL pH 7,4), frasco 4 com enzimas reagentes GOPOD. (glicoseoxidase mais peroxidase liofilizado), frasco 5 com solução padrão de D-Glicose (5 mL) e frasco 6 com padrão (amido de milho, 5g).
- Etanol 80%
- Ácido acético glacial
- Hidróxido de sódio 1M (4g/mL)
- Cloreto de cálcio di-hidratado
- Ácido clorídrico

Equipamentos

- Balança analítica
- Centrífuga
- Vórtex
- Banho maria (50 °C)
- Banho de água fervente
- Pipetas
- pHmetro
- Espectrofotômetro (510 nm)
- Tubos de vidro
- Balão volumétrico (100 mL)

Preparo das soluções

- Tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0): adicionar 5,8 mL de ácido acético glacial a 900mL de água destilada. Ajustar o pH para

5,0 por adição de solução de hidróxido de sódio 1 M (aproximadamente 30 ml são necessário). Adicionar 0,74 g de cloreto de cálcio di-hidratado e dissolver. Ajustar o volume para 1 litro e armazenar o tampão a 4 ° C (estável durante 6 meses).

- Solução 1: Diluir 1,0 mL do conteúdo do frasco 1 a 30 ml do tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0). Dividir em tamanho adequado de alíquotas e congelar a -20°C. Estável por 3 anos.
- Reagente GOPOD: 1) Diluir o conteúdo do frasco 3 com 1 L de água destilada (solução 3); 2) Dissolver o conteúdo do frasco 4 em 20 mL da solução 3 e quantitativamente transferir isso para o frasco contendo o restante da solução a 3. Cubra esta garrafa com folha de alumínio para proteger o reagente da luz. Estável por aproximadamente 3 meses a 2-5 °C ou 12 meses a -20 °C.
- Soluções 2, 5 e 6: utilizar como fornecidos

Procedimentos

- a. Moer amostra de modo a passar por uma peneira de 0,5 mm.
- b. Adicionar 100 mg da amostra em tubo de ensaio de vidro. Bater no tubo para assegurar que todas as amostras caiam para a parte inferior do tubo.
- c. Adicionar 0,2 mL de solução aquosa de etanol (80% v/v) e agitar no vórtex.
- d. Imediatamente adicionar 3 mL da solução 1. Incubar o tubo em banho-maria fervente durante 6 minutos (agitar o tubo vigorosamente depois de 2, 4 e 6 minutos).
- e. Adicionar 0,1 mL do conteúdo do frasco 2, agitar nos vórtex e incubar a 50 °C durante 30 min.
- f. Transfira a totalidade do conteúdo do tubo de ensaio para um balão volumétrico de 100 mL. Use uma piceta para lavar o conteúdo do tubo completamente. Ajuste o volume com água destilada. Misture bem. Centrifugar uma alíquota desta solução a 3000 rpm durante 10 min. Usar a parte límpida para o ensaio.

Alternativamente, no passo 6, ajustar o volume para 10 mL com água destilada e, em seguida, centrifugar os tubos a 3.000 rpm por 10 min. Para as amostras contendo 1-10% de teor de amido, esta solução é utilizado diretamente no passo 7. Para as amostras contendo 10-100%

de amido, uma alíquota (1,0 mL) é diluída até 10 mL com água destilada antes de prosseguir para o passo 7.

g. Transferir as alíquotas em duplicata (0,1 mL) da solução diluída, para os tubos de ensaio de vidro.

h. Adicionar 3,0 mL do reagente GOPOD a cada tubo, incluindo o controle de D-glicose e o de reagentes em branco, e incubar os tubos a 50 °C durante 20 min. Controle consiste em 0,1 mL de solução padrão de D-glicose (1 mg/mL) e 3,0 mL de reagente GOPOD e o branco em 0,1 mL de água e 3,0 mL de reagente GOPOD.

i. Leia a absorbância para cada amostra e o controle de D-glicose em 510 nm contra o reagente branco.

Cálculos

$$\text{Amido} = A \times F \times \frac{FV}{0,1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180}$$

$$\text{Amido} = A \times \frac{F}{W} \times FV \times 0,9$$

Onde:

A= Absorbância (reação) lida contra o branco;

F = $\frac{100 \text{ (}\mu\text{g de D-glicose)}}{\text{absorbância para } 100 \mu\text{g de glicose}}$ (conversão de absorbância para μg);

FV= Volume final (isto é, igual a 100 mL ou 10 mL);

0,1= Volume da amostra analisada;

$\frac{1}{1000}$ = Conversão de μg para mg;

$\frac{100}{W}$ = Fator que expressa amido como porcentagem do peso da amostra;

W = Peso em mg da amostra analisada;

$\frac{162}{180}$ = Ajuste de D-glicose livre para D-glicose anidro.