

Luciana Reis Fontinelle Souto

**VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE *Landoltia punctata*
COM VISTAS A UMA PRODUÇÃO DE ETANOL**

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

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Débora Oliveira

Florianópolis
2016

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

Souto, Luciana Reis Fontinelle

Valorização Biotecnológica de *Landoltia punctata* com Vistas a uma
Produção de Etanol / Luciana Reis Fontinelle Souto ; orientador, Jorge Luiz Ninow
; coorientadora, Débora de Oliveira - Florianópolis, SC, 2016.

161 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. biomassa lignocelulósica. 3. acúmulo de
amido. 4. lemnas. 5. açúcares fermentescíveis. I. Ninow, Jorge Luiz. II. De Oliveira,
Débora. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE *Landoltia punctata*
COM VISTAS A UMA POSTERIOR PRODUÇÃO DE
ETANOL**

Por

Luciana Reis Fontinelle Souto

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Orientador

Profa. Dra. Débora De Oliveira
Coorientadora

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi
Coordenador

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Dra. Estela de Oliveira Nunes

Profa. Dra. Marcia Luciane Lange Silveira

Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Mohedano

Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto

Prof. Dr. Marco Di Luccio

Florianópolis, 8 de novembro de 2016

Dedico à minha vizinha Celina, meu
poço de doçura.

AGRADECIMENTOS

Gratidão aos queridos professores e colegas de doutorado pelos ensinamentos compartilhados.

Gratidão aos colegas do Engebio pela troca no laboratório, almoços, cafés e amizade. Aos meus IC's, Daniela e Pedro, pela contribuição no trabalho e parceria. Ao Rodrigo pela grande ajuda na parte experimental com as lemnas.

Gratidão à minha querida co-orientadora Débora pela ajuda, incentivo, presença, dedicação e ensinamentos.

Gratidão ao professor Keith por aceitar a realização do meu doutorado sanduíche no *Institute Food Research*, por suas ideias e ajuda. Aos meus queridos supervisores Sam e Adam pela impecável orientação, pela paciência em me ensinar e pela grande ajuda na parte experimental. À Isadora pela parceria no laboratório, amizade, ensinamentos, traduções e *pints*. E a todos que convivi durante esse período mágico da minha vida, a tudo que aprendi e ao quanto eu cresci e evolui como pessoa, minha eterna gratidão.

Gratidão à minha família e aos meus amigos pelo apoio e torcida de sempre. Ao Caio pela doce presença, por todo o amor compartilhado e pela força e motivação para seguir. À minha amada gatinha Frida, minha companheira incansável, sempre comigo ao lado do computador.

Gratidão imensa e especial ao meu querido orientador Jorge pela convivência, amizade, motivação, ensinamentos e boas risadas. À Dora pelo cuidado, carinho, incentivo e companhia. Vocês são seres inspiradores, muito obrigada pela enorme ajuda, por me conceder um lar e uma família.

Gratidão à Universidade Federal de Santa Catarina, à Capes e ao CNPq.

Gratidão Floripa por esses anos de muita alegria, descoberta, mudança, aprendizado, encantamento e evolução.

“Uma pessoa inteligente resolve um problema, um sábio o previne.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A lemna tem sido apontada como uma biomassa potencial para a produção de etanol, devido a sua capacidade de acumular amido, possuir altas velocidades de crescimento, baixo teor de lignina, dentre outras características. Neste trabalho a produção de etanol a partir da biomassa de lemna (*Landoltia punctata*) foi avaliada. O estudo foi dividido em duas partes. A primeira parte avaliou a hidrólise enzimática simultânea das frações amilácea e celulósica, sem o uso de pré-tratamento, da biomassa de lemna submetida ao acúmulo de amido. A segunda parte avaliou o efeito do pré-tratamento hidrotérmico na fração celulósica da biomassa de lemna submetida à sacarificação e fermentação simultânea (SFS). O acúmulo de amido em lemna foi influenciado pela escassez de nutrientes. Na simples transferência das lemnas do sistema de tratamento de efluente doméstico para água de rede de abastecimento submetidas às condições climáticas não controladas, o teor de amido atingiu 27%. Quanto à liquefação do amido, sua eficiência foi de 60,5% em 3 horas (lemna 7% m v⁻¹; pH 5; 50 rpm; 65 °C e α -amilase 10% (v m⁻¹). A maior eficiência da sacarificação do amido foi de 98,99% em 8 horas (pH 5; 45 °C, 100 rpm, amiloglicosidase 1%, v m⁻¹; e pectinase 0,3%, v m⁻¹). A enzima complementar (Htec) para a hidrólise da celulose não apresentou efeito significativo na eficiência da reação. A maior eficiência da sacarificação simultânea do amido e da celulose da biomassa de lemna sem pré-tratamento foi de 82% em 4 horas (pH 5; 45 °C; 100 rpm, amiloglicosidase 1%, v m⁻¹; e pectinase 0,3%, v m⁻¹ e celulase 20%, v m⁻¹). Em relação à segunda parte desse estudo, o pré-tratamento hidrotérmico resultou na solubilização dos açúcares não-celulósicos. Na melhor condição (200 °C, 10 minutos, fator de severidade 3,9), a conversão em etanol foi de 88,81%, valor esse 63% maior ao encontrado na biomassa não tratada. Sendo assim, em relação à primeira parte do estudo, a produção de açúcares fermentescíveis a partir da biomassa de lemna se mostrou promissora, levando em consideração a capacidade de acumular amido por meio de um processo simples, às condições amenas da hidrólise enzimática e à alta eficiência do processo em tempo relativamente curto. Em relação à segunda parte, o pré-tratamento hidrotérmico se mostrou adequado para maximizar a conversão de etanol da fração celulósica da biomassa de lemna submetida à SFS.

Palavras-chave: biomassa lignocelulósica, acúmulo de amido, lemna, açúcares fermentescíveis, etanol.

ABSTRACT

Duckweed has been identified as a potential biomass for the production of ethanol, due to its ability to accumulate starch, high growth rates and low lignin content. Production of ethanol from duckweed biomass was evaluated. This research was divided into two steps. The first step evaluated simultaneous enzymatic hydrolysis of the starchy and the cellulosic fraction without the use of pretreatment of biomass duckweed subjected to starch accumulation. The second step evaluated the effect of the hydrothermal pre-treatment in the cellulosic fraction of biomass duckweed subjected to simultaneous saccharification fermentation (SSF). Starch accumulation in duckweed was influenced by the starvation of nutrients. In simple transfer of duckweed to wastewater treatment system to tapwater subject to weather conditions not controlled, the starch content reached 27%. As for starch liquefaction efficiency was 60.5% at 3 hours (Duckweed 7% w / v; pH 5; 50 rpm; 65 ° C and α -amylase 10% v / w). The greater efficiency of the starch saccharification was 98.99% in 8 hours (pH 5, 45 ° C, 100 rpm, amyloglucosidase 1% v / w, and 0.3% pectinase, v / w). The additional enzyme for the hydrolysis of the cellulose had no significant effect on the reaction efficiency. The greater efficiency of simultaneous saccharification of starch and cellulose biomass duckweed without pre-treatment was 82% in 4 hours (pH 5, 45 ° C, 100 rpm, amyloglucosidase 1% v / w, and 0.3% pectinase v / w cellulase 20% v / w). In the second step of this research, the hydrothermal pretreatment resulted in the solubilization of non-cellulosic sugars. In the best condition (200 ° C, 10 minutes and severity factor 3.9), conversion to ethanol was 88.81%, an amount 63% higher to that found in untreated biomass. Thus, in the first step of the research, the production of fermentable sugars from biomass duckweed proved promising, taking into account the capacity to accumulate starch through a simple process at mild conditions of enzymatic hydrolysis and high process efficiency in a relatively short time. In the second step, the hydrothermal pre-treatment is adequate to maximize the ethanol conversion of cellulose fraction of biomass duckweed submitted to SSF.

Keywords: lignocellulosic biomass, starch accumulation, duckweed, fermentable sugars, ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organograma do documento da tese.....	29
Figura 2. Produção de etanol no Brasil nos últimos vinte anos.....	37
Figura 3. Imagens de <i>Landoltia punctata</i> : 1- fronde; 2- raízes; 3- vista inferior da fronde; 4- fronde filha.....	41
Figura 4. a) Ligações α -1,4 da molécula de amilose. b) Ligações α -1,4 e α -1,6 da molécula de amilopectina.....	49
Figura 5. Ação da enzima α -amilase sobre as frações do amido, amilose e amilopectina.	52
Figura 6. Estrutura dos principais constituintes da biomassa lignocelulósica.....	54
Figura 7. Estrutura química da celulose.	56
Figura 8. Componentes da fração hemicelulose.....	58
Figura 9. Derivados do álcool cinâmico (a): álcool trans-p-cumárico (b), álcool trans-coniferílico (c) e álcool trans-sinapílico (d).....	58
Figura 10. Ação das celulasas sobre a molécula de celulose.	64
Figura 11. Catabolismo da fermentação alcoólica.	65
Figura 12. Esquema geral da etapa de hidrólise enzimática simultânea da fração amilácea e celulósica de lemna (<i>Landoltia punctata</i>) sem o uso de pré-tratamento.	71
Figura 13. Imagem do sistema de tratamento com lagoas de lemnas em escala piloto, onde: 1) Tanque de equalização; 2) Lagoa de Lemnas 1; 3) Lagoa de Lemnas 2.	72
Figura 14. Coleta da biomassa de lemna e experimento do efeito da escassez de nutrientes sobre o acúmulo de amido em lemnas.....	75

Figura 15. Ensaio sob escassez de nutrientes em escala piloto para o acúmulo de amido em lemnas: a) condições ambientais controladas; b) condições ambientais não controladas.	76
Figura 16. Biomassa seca e moída de lemna enriquecida em amido... 77	77
Figura 17. Liquefação do amido de lemna em banho termostato com agitação.	78
Figura 18. Efeito da escassez de nutrientes no acúmulo de amido em lemnas. Água destilada, FP 16/8h, IL 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura 25 °C.	88
Figura 19. Diagrama de Pareto para a eficiência da sacarificação do amido de lemna.	101
Figura 20. (a) Gráfico de superfície de resposta e (b) Gráfico de curva de nível, sobre a eficiência da sacarificação do amido de lemna em função do pH e da temperatura, com a agitação fixa no ponto central (100 rpm).	104
Figura 21. (a) Gráfico de superfície de resposta e (b) Gráfico de curva de nível, sobre a eficiência da sacarificação do amido de lemna em função do pH e da agitação, com a temperatura fixa no ponto central (50 °C).	105
Figura 22. Cinética da sacarificação da celulose de lemna com diferentes concentrações de Htec (0, 1 e 2%, v m^{-1}). pH 5,0; temperatura de 45 °C, agitação 100 rpm, concentração de Ctec 5% (v m^{-1}).....	106
Figura 23. Cinética da sacarificação da celulose de lemna com diferentes concentrações de Ctec (5, 10 e 20%, v m^{-1}). pH 5,0; temperatura de 45 °C, agitação 100 rpm.....	107
Figura 24. Eficiência da hidrólise enzimática simultânea do amido e celulose de lemna não tratada.	108
Figura 25. Pré-tratamento hidrotérmico da biomassa de lemna.....	113
Figura 26. Placas com microtubos de 1 mL utilizadas na fermentação e sacarificação simultânea da biomassa de lemna.	115

Figura 27. Fermentação e sacarificação simultânea da biomassa de lemna pré-tratada.	116
Figura 28. Teores de fucose e ramnose (g Kg^{-1}) da BPT nas diferentes temperaturas e da biomassa não tratada (UT).	121
Figura 29. Teores de arabinose, galactose e xilose (g Kg^{-1}) da BPT nas diferentes temperaturas e da biomassa não tratada (UT).....	121
Figura 30. Teores de glicose e açúcares totais (g Kg^{-1}) da BPT nas diferentes temperaturas e da biomassa não tratada (UT).....	122
Figura 31. Teores de fucose e ramnose ($\mu\text{g/mL}$) dos licores submetidos à análise de açúcares por GC (hidrólise $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$).....	123
Figura 32. Teores de arabinose, xilose e galactose ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos licores submetidos à análise de açúcares por GC (hidrólise $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$).	124
Figura 33. Teores de glicose e açúcares totais ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos licores submetidos à análise de açúcares por GC (hidrólise $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$).	124
Figura 34. Microscopia da biomassa de lemna pré-tratada. Tecido foi corado com iodo (40x). a) tecido não tratado. b) $130 \text{ }^\circ\text{C}$. c) $170 \text{ }^\circ\text{C}$. d) $190 \text{ }^\circ\text{C}$. e) $210 \text{ }^\circ\text{C}$. f) $230 \text{ }^\circ\text{C}$	126
Figura 35. Conversão em etanol ($\%$, m m^{-1}) da biomassa de lemna pré-tratada hidrotermicamente submetida à SFS.	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variação da composição química de lemnáceas em base seca.	43
Tabela 2. Métodos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos para hidrólise enzimática.....	61
Tabela 3. Características da lagoa de lemna para o tratamento de efluentes.	72
Tabela 4. Variáveis e níveis estudados no DCCR 2 ³ para a otimização da sacarificação do amido de lemnas.	81
Tabela 5. Alíquotas da solução de reação da amostra, amido e branco para atividade enzimática da α -amilase.....	84
Tabela 6. Alíquotas da solução de reação da amostra e branco para análise da atividade enzimática da amiloglucosidase.....	85
Tabela 7. Alíquotas para preparo do branco, amostra e padrão para determinação de concentração de glicose.....	85
Tabela 8. 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.....	87
Tabela 9. Teores de amido (%) nos tratamentos AD e AR. FP 16/8h, IL 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura 25 °C.	90
Tabela 10. Teores de amido em lemnas sob condições ambientais controladas (T1: FP 16/8h, IL 100 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ e temperatura 25 °C) e sob variações climáticas (T2).	91
Tabela 11. Composição da biomassa de lemnas em base seca.....	92
Tabela 12. Efeito da concentração de lemna (4%, 7% e 10%, m v^{-1}) na eficiência da liquefação do amido de lemna.....	94
Tabela 13. Efeito do pH na eficiência da liquefação do amido de lemna.	95

Tabela 14. Efeito da agitação na eficiência da liquefação do amido de lemna.....	96
Tabela 15. Efeito da temperatura na eficiência da liquefação do amido de lemna.....	97
Tabela 16. Efeito da concentração de enzima na eficiência da liquefação do amido de lemna.	98
Tabela 17. Matriz do delineamento composto central rotacional 2 ³ (DCCR) e a eficiência da sacarificação do amido de lemna.	99
Tabela 18. Análise dos efeitos das variáveis sobre a eficiência da sacarificação do amido de lemna.	100
Tabela 19. Análise de variância (ANOVA) das variáveis sobre a eficiência da sacarificação do amido de lemna.	103
Tabela 20. Valores de pH e temperatura utilizados para a determinação da atividade enzimática da α -amilase, amiloglucosidade e celulase segundo metodologia e nas condições otimizadas do processo de hidrólise.	109
Tabela 21. Atividade enzimática da α -amilase, amiloglucosidade e celulase segundo metodologia (Atividade 1) e nas condições otimizadas do processo de hidrólise (Atividade 2).....	109
Tabela 22. Composição do meio de cultura para manutenção da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 2826.....	114
Tabela 23. Composição de monossacarídeos de <i>L. punctata</i> (g kg ⁻¹).119	
Tabela 24. Recuperação da matéria seca após pré-tratamento hidrotérmico.	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD: água destilada
AR: água de rede de abastecimento
BPT: biomassa pré-tratada
BSM: biomassa seca e moída
Cellic CTec2: complexo celulolítico, com elevada quantidade de β -glucosidasas
Cellic Htec2: endoxilanasas com especificidade para hemicelulose
DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio
DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional
DQO: Demanda Química de Oxigênio
FT: fotoperíodo
GC: cromatografia gasosa
IL: intensidade luminosa
Pectinex Ultra AFP: enzima pectinase
rpm: rotação por minuto
Spirizyme Fuel: enzima amiloglucosidase
SFS: sacarificação e fermentação simultânea
Termamyl 2x: enzima α -amilase
T1: tratamento condições controladas
T2: tratamento condições não controladas
U: unidade enzimática
UT: biomassa não tratada

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	31
1.1 OBJETIVOS.....	33
1.1.1 Objetivo Geral.....	33
1.1.2 Objetivos Específicos.....	33
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	35
2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS.....	35
2.1.1 Aspectos gerais.....	35
2.1.2 Etanol: o principal biocombustível.....	35
2.2 LEMNA.....	39
2.2.1 Aspectos gerais.....	39
2.2.2 Espécie <i>Landoltia punctata</i>.....	40
2.2.3 Utilização de lemnas.....	41
2.3 BIOMASSA AMILÁCEA.....	48
2.3.1 Aspectos gerais.....	48
2.3.2 Amido.....	48
2.3.3 Hidrólise enzimática do amido.....	50
2.4 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	53
2.4.1 Aspectos gerais.....	53
2.4.2 Celulose.....	55
2.4.3 Hemicelulose.....	56
2.4.4 Lignina.....	57
2.5 PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	59
2.5.1 Aspectos gerais.....	59
2.5.2 Pré-tratamento.....	59

2.5.3 Hidrólise enzimática da biomassa.....	63
2.5.4 Fermentação alcoólica.....	65
2.6 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE.....	67
CAPÍTULO 3 – ACÚMULO DE AMIDO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE LEMNA (<i>Landoltia punctata</i>) SEM PRÉ-TRATAMENTO.....	69
3.1 INTRODUÇÃO.....	69
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	70
3.2.1 Matéria-prima.....	70
3.2.2 Enzimas.....	73
3.2.3 Acúmulo de amido.....	74
3.2.4 Produção da biomassa enriquecida em amido e sua caracterização.....	76
3.2.5 Hidrólise enzimática.....	77
3.2.6 Metodologia descritiva.....	82
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	88
3.3.1 Acúmulo de amido.....	88
3.3.2 Caracterização físico-química da matéria-prima.....	92
3.3.3 Hidrólise enzimática.....	94
3.3.4 Sacarificação simultânea do amido e da celulose de lemna sem pré-tratamento.....	99
3.3.5 Atividade enzimática.....	108
CAPÍTULO 4 – FERMENTAÇÃO E SACARIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DA BIOMASSA DE LEMNA (<i>Landoltia punctata</i>) SUBMETIDA AO PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO....	111
4.1 INTRODUÇÃO.....	111
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	112
4.2.1 Matéria-prima.....	112

4.2.2 Pré-tratamento hidrotérmico.....	113
4.2.3 Micro-organismo.....	114
4.2.4 Sacarificação e Fermentação simultânea - SFS.....	115
4.2.5 Metodologia descritiva.....	116
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	118
4.3.1 Caracterização da BSM.....	118
4.3.2 Recuperação do material após pré-tratamento hidrotérmico.....	119
4.3.3 Efeito do pré-tratamento nos teores de açúcares da BPT.....	120
4.3.4 Efeito do pré-tratamento nos teores de açúcares dos licores.....	123
4.3.5 Impacto visual do pré-tratamento hidrotérmico nos tecidos de lemna.....	125
4.3.6 Produção de etanol por SFS de lemna pré-tratada.....	126
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES FINAIS.....	129
REFERÊNCIAS.....	131
ANEXO 1 – ANÁLISE DE AMIDO.....	160
ANEXO 2 – QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA AR.....	161

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE LEMNAS (*Landoltia punctata*) PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

Por quê?

- ✓ A lemna tem sido apontada como uma matéria-prima promissora para a produção de biocombustível
- ✓ Estimativas de rendimento de etanol a partir de lemnas têm chegado a valores maiores que do milho
- ✓ Pré-tratamento hidrotérmico tem sido relatado como um tratamento de menor impacto

Quem já fez?

- ✓ São poucos os trabalhos que realizam tanto a hidrólise da fração amilácea quanto da fração celulósica da lemna
- ✓ Não constam na literatura trabalhos sobre a SFS de lemna (*Landoltia punctata*) submetida ao pré-tratamento hidrotérmico

Hipóteses

- É possível acumular amido em lemna (*Landoltia punctata*) em escala piloto sob condições climáticas não controladas em Florianópolis
- É possível obter alta eficiência da hidrólise simultânea do amido e da celulose de lemna sem o uso de pré-tratamento
- É possível aumentar a conversão a etanol da fração celulósica da biomassa de lemna submetida ao pré-tratamento hidrotérmico?

Metodologia experimental

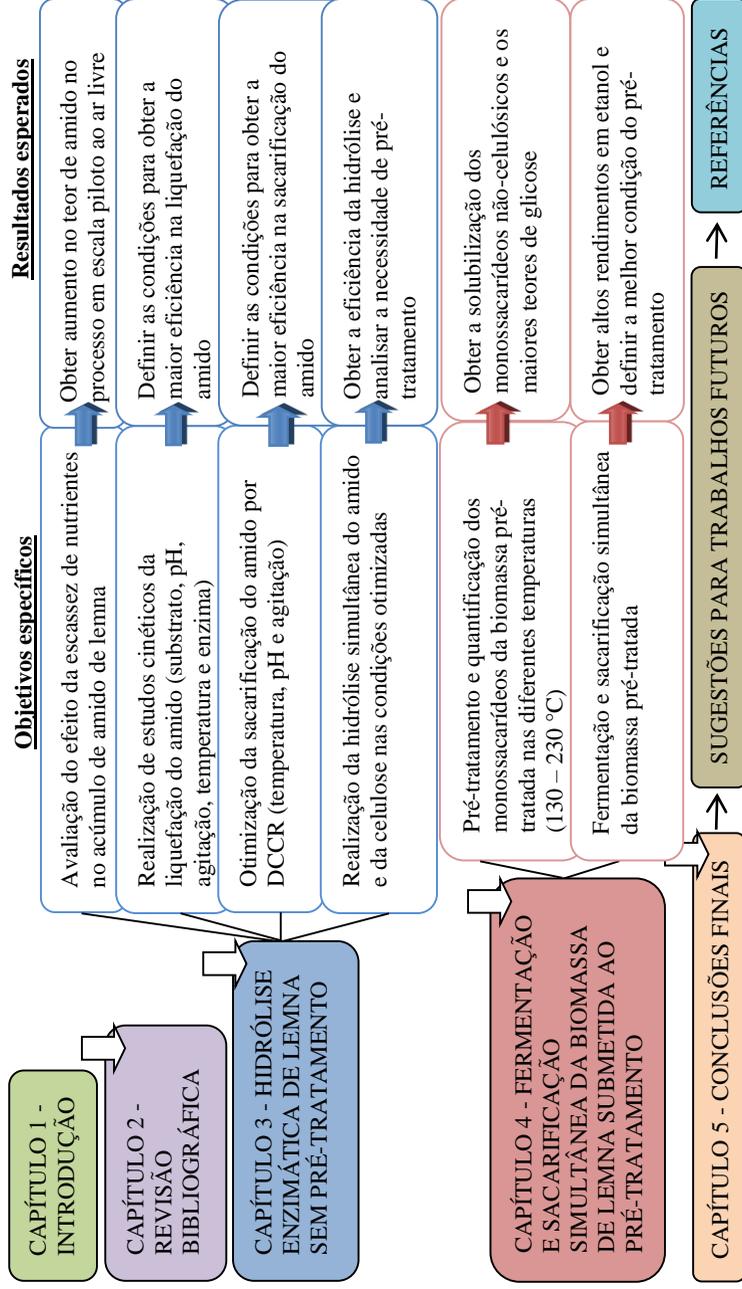
- Cinéticas para avaliar o efeito das condições da liquefação do amido
- DCCR para a otimização da sacarificação do amido
- Quantificação dos açúcares da biomassa tratada e licores por cromatografia gasosa e etanol por cromatografia líquida

Resposta

- Determinar condições experimentais que conduzam a maior eficiência na hidrólise simultânea do amido e da celulose de lemna
- Obter maiores conversões em etanol na fração celulósica através do pré-tratamento hidrotérmico

Este documento será apresentado conforme organograma apresentado na Figura 1.

Figura 1. Organograma do documento da tese.



CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

A demanda mundial por energia tem aumentado significativamente devido, principalmente, à rápida industrialização e crescimento populacional acelerado (JAMBO et al., 2016). Em contrapartida, a principal fonte de energia atualmente, os combustíveis fósseis, estão em declínio. A poluição ambiental e o aumento dos preços desses estão entre os muitos problemas de energia que se enfrenta hoje. Dessa forma, esforços mundiais estão sendo dirigidos para o desenvolvimento de combustíveis alternativos, ambientalmente não nocivos e eficientes (MURADOV et al., 2010). Nesse sentido, os biocombustíveis surgem como uma alternativa promissora de recurso energético mundial.

O principal biocombustível é o etanol produzido 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). Embora o etanol de milho e de cana-de-açúcar sejam substitutos promissores para a produção de gasolina, eles não são suficientes para suprir a demanda mundial (BELL; ATTFIELD, 2006; RFA, 2010). Além disso, as preocupações éticas sobre o uso de alimentos como matéria-prima para produção de combustível têm incentivado pesquisas e esforços no sentido de utilizar o potencial de matérias-primas não comestíveis (SUN; CHENG, 2002).

Nesse contexto, os materiais de biomassa lignocelulósica constituem um substrato renovável substancial para a produção de etanol. Contudo, a biomassa lignocelulósica é um material que exige um pré-tratamento para o seu processamento (HIMMEL et al., 2007). O pré-tratamento, o passo mais caro na produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, é de particular preocupação para tornar o etanol de segunda geração viável economicamente (LIMAYEM; RICKE, 2012). A necessidade dos pré-tratamentos ocorre devido à natureza de proteção da lignina geralmente presente nessas biomassas (HIMMEL et al., 2007; WALDRON, 2010). Uma alternativa a essa questão seria a produção de etanol a partir de uma biomassa com baixo teor de lignina. Nesse contexto, a biomassa de lemna pode vir a ser uma fonte promissora para a produção de bioetanol de segunda geração (JARVIS; FORSYTH; HENRY, 1988).

A lemna é conhecida popularmente no Brasil como “lentilha d’água” ou “marrequinha”, pertencente ao gênero de plantas aquáticas da subfamília Lemnoideae. Elas vêm sendo utilizadas com sucesso no tratamento de efluentes (MOHEDANO, 2010). Nos últimos anos, a lemna tem sido apontada como uma matéria-prima potencial para a produção de

etanol, devido à sua elevada proporção de hidratos de carbono e baixo teor de lignina, o que a torna uma fonte de celulose mais facilmente hidrolisável e, conseqüentemente, mais adequada para a conversão em bioetanol de segunda geração. Essas plantas aquáticas são adaptáveis às mais variadas localidades e climas, possuem ainda velocidade de crescimento mais rápida do que outras plantas superiores (LANDOLT; KANDELER, 1987; JARVIS; FORSYTH; HENRY, 1988; HIMMEL et al., 2007; WALDRON, 2010). Além disso, a lemna é geralmente um subproduto do tratamento de efluentes que não compete por terras agrícolas, o que torna ainda mais interessante a sua valorização por meio da produção de etanol.

Como uma das principais características, as lemnas são capazes de acumular amido dependendo das condições de cultivo, em especial, sob a escassez de nutrientes (REID; BIELESKI, 1970; EYSTER, 1978; LANDOLT; KANDELER, 1987; THORSTEINSSON; TILLBERG, 1987; CIERESZKO; BARBACHOWSKA, 2000). Estudos têm concentrado esforços em maximizar o teor de amido nas lemnas e valores entre 20 a 45% têm sido relatados (CHENG; STOMP, 2009; FARRELL, 2012; TAO et al., 2013; XIAO et al., 2013; HUANG et al., 2014; SREE; APPENROTH, 2014).

Em relação à hidrólise enzimática da lemna, altas taxas de conversão do amido têm sido alcançadas seguindo diferentes tratamentos enzimáticos (CHENG; STOMP, 2009; CHEN et al., 2012). Bons rendimentos de glicose também foram atingidos a partir da fração celulósica usando um *mix* de celulases e explosão a vapor como pré-tratamento (ZHAO et al., 2012; ZHAO et al., 2015a; ZHAO et al., 2015b). No entanto, parece haver pouca investigação sobre a hidrólise enzimática simultânea da fração amilácea e da fração celulósica da lemna. Além disso, a explosão a vapor é relatada com um tratamento que resulta na formação de grande quantidade de inibidores indesejáveis na fermentação (PEDERSEN; MEYER, 2010). Já o tratamento hidrotérmico tem sido relatado com um tratamento que tem significativamente menor impacto ambiental, menor investimento de capital, evita a formação de produtos químicos e possui baixa geração de subproduto.

Dessa forma, esse trabalho verificou a hidrólise enzimática simultânea da fração amilácea e da fração celulósica sem o uso de pré-tratamento. Em seguida, analisou o efeito do pré-tratamento hidrotérmico na fração celulósica da lemna submetida à fermentação e sacarificação simultânea.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Estudar a valorização da biomassa de lemna (*Landoltia punctata*) visando à produção de etanol.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Valorizar a biomassa de lemnas obtida em sistemas de tratamentos de efluentes domésticos através da transformação do seu amido e celulose em açúcares fermentescíveis por meio da hidrólise enzimática:
 - Estudar o acúmulo de amido em lemnas;
 - Avaliar o efeito da escassez de nutrientes utilizando água destilada e água potável de rede de abastecimento;
 - Ampliar a escala do ensaio de acúmulo de amido sob condições ambientais não controladas (temperatura e fotoperíodo);
 - Efetuar a caracterização físico-química da biomassa de lemna enriquecida em amido quanto ao seu teor de proteína bruta, de celulose, de amido e umidade;
 - Estudar e desenvolver o processo de hidrólise enzimática de lemna;
 - Avaliar o efeito da concentração de substrato, pH, agitação, temperatura e concentração de enzima na liquefação do amido de lemna;
 - Avaliar o efeito da concentração das celulasas na sacarificação da celulose de lemna;
- Analisar o efeito do pré-tratamento hidrotérmico na fração celulósica da biomassa de lemna submetida ao processo SFS (Sacarificação e Fermentação Simultânea):
 - Caracterizar a biomassa de lemna quanto ao seu perfil de monossacarídeos;
 - Avaliar o efeito da temperatura do pré-tratamento hidrotérmico na fração celulósica da biomassa de lemna;
 - Analisar o rendimento da SFS na biomassa pré-tratada nas diferentes temperaturas.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

2.1.1 Aspectos gerais

O termo biocombustível se refere aos combustíveis líquidos ou gasosos produzidos a partir de biomassa, destinados, principalmente, ao setor de transportes. Os biocombustíveis líquidos incluem o metanol, etanol, butanol e biodiesel, e os biocombustíveis gasosos compreendem o hidrogênio e o metano (DEMIRBAS, 2008).

No que diz respeito à matriz energética mundial, os biocombustíveis e as fontes de carbono fóssil correspondem a 10,2% e 81,2%, respectivamente (IEA, 2016). O petróleo é a principal fonte de energia atualmente. Entretanto, devido ao esgotamento progressivo deste e às ameaças ambientais que a exploração de fontes não renováveis ocasiona, especialmente em termos de emissões de CO₂, a busca por fontes de energia renovável torna-se cada vez mais necessária. Neste contexto, se encontra o etanol, o principal biocombustível empregado mundialmente, com estimativas de atingir 27% da energia mundial em 2050 (NRC, 2000; ANP, 2012; IEA, 2016).

2.1.2 Etanol: o principal biocombustível

O etanol, também conhecido como álcool etílico (C₂H₆O), é produzido desde os tempos antigos pela fermentação de açúcares presentes em matéria-prima de origem vegetal, tais como cereais, beterraba, batata e cana-de-açúcar (ROEHR, 2001). No entanto, somente no início do século XX, tornou-se conhecido o seu potencial como combustível, o que levou ao desenvolvimento de vários métodos de produção de etanol em larga escala (SOLOMON; BARNES; HALVORSEN, 2007).

O uso do etanol tem suscitado grande interesse devido à alta dos preços e aos problemas ambientais causados pelos combustíveis fósseis. Trata-se de um produto renovável que contribui para a redução do efeito estufa e diminui substancialmente a poluição do ar, minimizando os seus impactos na saúde pública (IEA, 2013).

2.1.2.1 Panorama e perspectivas da produção de etanol no Brasil

Devido a questões políticas, econômicas e ambientais, a demanda mundial de etanol sofreu variações ao longo do tempo. Em outubro de 1973, o panorama mundial mudou drasticamente, quando teve início a Guerra de Yom Kippur, um conflito entre árabes e israelenses. Com o fim da guerra o custo do barril de petróleo aumentou 300%. A partir desse momento, o mundo passou a refletir melhor sobre a questão energética e medidas foram adotadas por diversos países para conter a dependência da importação do petróleo (PEREIRA, 2008). Essa mudança reacendeu o interesse mundial por outras fontes de energia e levou diversos países a buscarem soluções mais adequadas, considerando as peculiaridades nacionais (BERTELLI, 2007).

Com a elevação dos preços do petróleo, somada ao risco de superprodução do açúcar, o Brasil adotou medidas a fim de resolver tanto a crise do petróleo quanto a do açúcar. Assim, o governo federal instituiu o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), mediante o Decreto 76.595 de 14/11/1975, firmado pelo então presidente Ernesto Geisel (BNDES, 2008).

Mediante uma intervenção governamental substancial para aumentar a oferta e a demanda por etanol, o Brasil desenvolveu capacidades institucionais e tecnológicas para o uso de energia renovável em larga escala (MUSSATTO et al., 2010). No período de 1973 a 1985, a produção foi de 660 milhões de litros por ano para 11,9 bilhões de litros (MAPA, 2015). Até o final dos anos 80, os veículos movidos exclusivamente a álcool hidratado representavam 85% dos veículos novos na frota nacional. No entanto, nessa época, problemas de logística no abastecimento, redução dos preços do petróleo e aumento da cotação internacional do açúcar tornaram o etanol pouco competitivo, o que levou à estagnação do Proálcool. Nos anos 1990, ocorreu, ainda, a desregulamentação estatal dos mercados de açúcar e álcool no país, o que aumentou a incerteza sobre o uso do etanol como combustível (GOLDEMBERG et al., 2004).

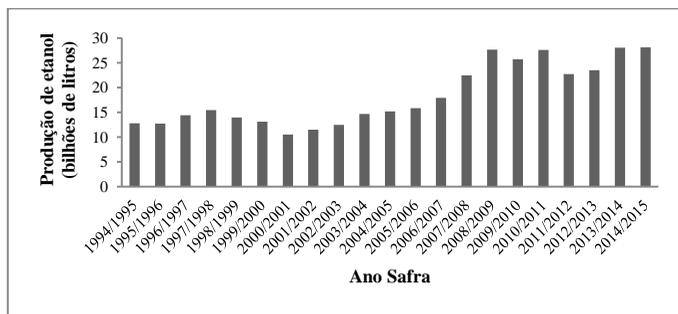
Em 2003, ocorreu a introdução dos veículos bicombustíveis (*flex fuel*) no mercado brasileiro, que deu início a uma nova onda de dinamismo no país. Promovidos por incentivos fiscais combinados com os elevados preços do petróleo, os veículos *flex* promoveram um rápido crescimento na produção de etanol de cana-de-açúcar (CINELLI, 2012).

Em 2009, o Brasil se tornou o maior exportador mundial de etanol, atingindo 3,3 bilhões de litros de etanol exportados. Entretanto, houve uma diminuição na produção nacional de 2009 para 2010, o que

ocasionou uma forte queda nas exportações e um aumento nas importações (SECEX, 2011). Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, sendo os EUA o primeiro (SHIKIDA et al., 2014).

Na Figura 2 pode-se observar a produção nacional de etanol nos últimos vinte anos.

Figura 2. Produção de etanol no Brasil nos últimos vinte anos.



Fonte: Elaborada a partir de dados do MAPA (2015).

Vários fatores contribuíram para as oscilações no cenário de produção nacional de etanol, especialmente o desequilíbrio criado entre oferta e demanda. Houve um aumento significativo da demanda por etanol, impulsionada pelo setor automotivo com os carros *flex*, enquanto, por outro lado, a oferta de etanol foi bastante afetada pela crise financeira mundial. Tal desequilíbrio foi, ainda, agravado por questões como: elevação do preço do açúcar no mercado internacional, com consequente aumento da destinação da cana para a produção de açúcar, e condições climáticas não favoráveis (SHIKIDA et al., 2014).

A produtividade agrícola nacional do setor sucroenergético sofreu quedas consideráveis nas últimas três safras, consequentemente refletindo na produção de etanol. Diversos fatores conjunturais podem explicar essa tendência, como a baixa renovação de canaviais e as adversidades climáticas verificadas nos últimos anos. Contudo, verifica-se uma clara redução dos incrementos ao longo dos anos, sugerindo a influência de fatores de caráter estrutural (melhoramento genético, máquinas e implementos). De fato, enquanto fatores conjunturais são ligados às oscilações de desempenho no curto prazo, fatores estruturais são responsáveis pela tendência de queda dos ganhos de produtividade no longo prazo. Entre os diversos fatores determinantes desse cenário, pode-

se dizer que o principal deles reside no fato de que o investimento no desenvolvimento tecnológico vem sendo feito em ritmo e intensidade aquém do desejado (NYKO et al., 2013).

Logo, o crescimento da demanda por combustíveis tem contrastado com a estagnação de investimentos na produção de etanol, o que se traduz em importações crescentes. Iniciativas como a implementação de usinas *flex*, unidades processadoras de outra matéria-prima durante o período de entressafra da cana-de-açúcar, vem surgindo a fim de incrementar a produção de etanol. Esse tipo de unidade permite, além de utilizar equipamentos subutilizados ou mesmo ociosos, aproveitar a energia excedente do processamento da cana-de-açúcar para aumentar a produção total de etanol da usina. Atualmente, há duas usinas de pequeno porte no Mato Grosso que já processam milho e cana-de-açúcar. Além dessas, existem apenas projetos de usinas para a região Centro-Oeste. Segundo Milanez et al. (2014), em razão dos méritos ambientais, econômicos e estratégicos, é oportuno que se avalie a criação de mecanismos que fomentem os investimentos em usinas *flex* no Brasil e, com isso, se construa uma solução para a urgente necessidade de aumentar a produção interna de etanol.

Analisando, portanto, a conjuntura do mercado nacional de etanol combustível, além de investimentos tecnológicos, é notória a necessidade de processos alternativos que busquem diminuir a dependência da produção nacional de etanol em relação à cana-de-açúcar, evitando que uma matriz energética de biocombustível esteja concentrada em apenas uma biomassa (CINELLI, 2012).

2.1.2.2 Etanol de segunda geração

Embora o etanol de milho e de cana-de-açúcar (89% da atual produção de bioetanol mundial) sejam substitutos promissores para a produção de gasolina, eles não são suficientes para suprir parte dos um trilhão de litros de combustível fóssil consumido atualmente em todo o mundo a cada ano (BELL; ATTFIELD, 2006; RFA, 2010). Além disso, as preocupações éticas sobre o uso de alimentos como matéria-prima para combustível têm incentivado pesquisas e esforços no sentido de utilizar o potencial de matérias-primas não comestíveis (SUN; CHENG, 2002). Nesse contexto, os materiais de biomassa lignocelulósica constituem um substrato renovável substancial para a produção de bioetanol que não competem com a produção de alimentos e ração animal. Estes materiais celulósicos também contribuem para a sustentabilidade ambiental

(DEMIRBAS, 2008). Além disso, a biomassa lignocelulósica pode ser fornecida em grande escala a partir de diferentes matérias-primas de baixo custo, tais como resíduos urbanos e industriais, madeira e resíduos agrícolas (HIMMEL et al., 2007).

Contudo, a biomassa lignocelulósica é um material que exige um pré-tratamento para o seu processamento (HIMMEL et al., 2007). O pré-tratamento, o passo mais caro na produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, é de particular preocupação para tornar o etanol de segunda geração viável economicamente (LIMAYEM; RICKE, 2012). A necessidade de pré-tratamentos deve-se a natureza de proteção da lignina geralmente presente nessas biomassas (HIMMEL et al., 2007; WALDRON, 2010). Uma alternativa a essa questão seria a produção de etanol a partir de uma biomassa com baixo teor de lignina. Nesse contexto, a biomassa de lemna apresenta potencial como fonte promissora para a produção de etanol de segunda geração (JARVIS; FORSYTH; HENRY, 1988).

2.2 LEMNA

2.2.1 Aspectos gerais

O termo “*Lemna*” designa um gênero de plantas aquáticas da subfamília Lemnoideae, antiga família Lemnaceae. Do latim, “limnus” significa lago, que se refere ao habitat natural dessas plantas (JOURNEY; SKILLCORN; SPIRA, 1993). No presente trabalho o termo foi utilizado como uma nomenclatura popular, generalizando lemna (e/ou lemnáceas) como um nome mais usual, inclusive para outros gêneros deste grupo botânico (MOHEDANO, 2010).

A subfamília Lemnoideae é composta das menores e mais simples angiospermas conhecidas, sendo frequentemente confundida com algas (LANDOLT; KANDELER, 1987). Porém, são macrófitas (vegetais superiores), monocotiledôneas possuidoras de sistema vascular, produzindo flores e frutos. Elas não são simplesmente versões em miniatura de angiospermas maiores, mas apresentam uma organização estrutural altamente modificada, resultando na alteração, simplificação ou perda de muitas características morfológicas e anatômicas (LANDOLT; KANDELER, 1987).

Devido ao tamanho diminuto de suas flores e à simplicidade estrutural, a taxonomia desse grupo é difícil e divergente entre os autores.

Foram descritos 5 gêneros: *Lemna*, *Wolffia*, *Landoltia*, *Spirodela* e *Wolffiella* e cerca de 40 espécies (JOURNEY; SKILLCORN; SPIRA, 1993; POTT, 2000). As plantas individuais variam em tamanho desde 1,5 cm de comprimento (*Spirodela polyrhiza*) para menos de um milímetro (*Wolffia globosa*) (LANDOLT; KANDELER, 1987).

2.2.2 Espécie *Landoltia punctata*

Devido ao aprimoramento das técnicas de biologia molecular, a taxonomia deste grupo botânico tem sofrido diversas mudanças. Les e Crawford (1999) descreveram um novo gênero, o *Landoltia* (derivado de *Spirodela*), cujo nome foi uma homenagem a Elias Landolt, um dos maiores pesquisadores deste grupo vegetal. Segundo os autores, a espécie *Spirodela punctata* se diferencia geneticamente de *Spirodela* e *Lemna*, sendo assim necessário propor um gênero separado para esta espécie, o gênero *Landoltia*. Desta forma, neste trabalho considera-se *Landoltia punctata* e *Spirodela punctata* como sinônimos.

A espécie *Landoltia punctata* foi descrita por Les e Crawford (1999) da seguinte forma: “*Frondes flutuantes na superfície, ovadas a lanceoladas, levemente assimétricas, 1,5-4x 1,3-3 mm; 1 1/5-2 vezes mais longas que largas; fronde inflada ou não inflada com 1 linha de papilas, ao centro, no lado superior da fronde; 2 cavidades reprodutivas ou vegetativas, laterais; às vezes com bordos avermelhados; frondes senescentes com células de pigmentos; raiz 2-5 por fronde de ca. 15 mm de comprimento*”. Sendo classificada como:

Reino: Plantae

Divisão: Angiospermae

Classe: Monocotyledoneae

Ordem: Arales

Família: Araceae (Lemnaceae)

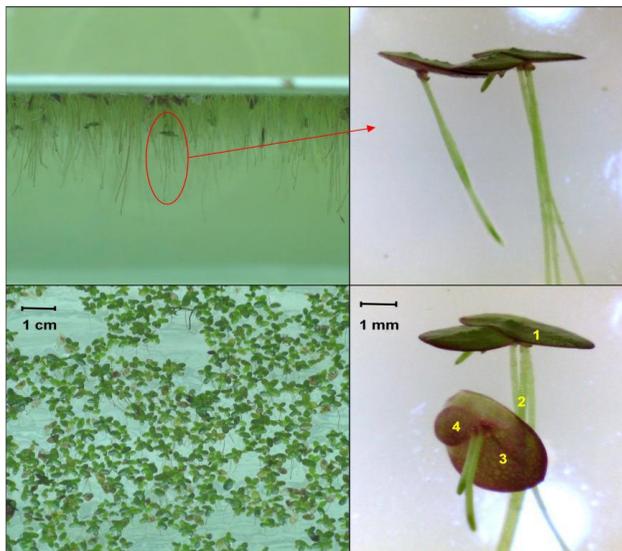
Sub-família: Lemnoideae

Gênero: *Landoltia*

Espécie: *Landoltia punctata*

Na Figura 3 pode-se observar imagens dessa espécie, coletada no ambiente natural, na região litorânea de Santa Catarina.

Figura 3. Imagens de *Landoltia punctata*: 1- fronde; 2- raízes; 3- vista inferior da fronde; 4- fronde filha.



Fonte: Mohedano (2010).

2.2.3 Utilização de lemnas

2.2.3.1 Tratamento de efluentes

O uso das lemnáceas para tratamento de efluentes tem despertado um grande interesse devido à sua rusticidade e eficiência. Isso porque elas apresentam elevada exigência de nitrogênio e fósforo; obtêm maiores velocidades de crescimento entre as plantas vasculares; 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 (JOURNEY; SKILLICORN; SPIRA, 1993; HAMMOUDA; GABER; ADBEL-HAMMED, 1995; BONOMO; PASTORELLI; ZAMBON, 1997; IQBAL, 1999; CHENG et al., 2002a).

Vários pesquisadores têm comprovado esta potencialidade de lagoas de lemnas no polimento de efluente, principalmente efluentes provenientes da suinocultura. A 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. Desses estudos, foi selecionada a espécie de lemnácea com melhor desempenho no tratamento de dejetos suínos, a *Landoltia punctata*. Os parâmetros avaliados foram remoção de nutrientes (N e P), taxa de crescimento e produção de proteína (BERGMAN et al., 2000).

Sistema de lagoas de *Landoltia punctata* também foi objeto de estudo para o polimento de efluentes provenientes da suinocultura em Santa Catarina. O estudo demonstrou que, além da almejada remoção de nitrogênio e fósforo, com eficiências médias de 98 e 94% respectivamente, ocorreu também a redução significativa de *E. coli* (3 log de LA) e matéria orgânica oxidável (97% para DQO e 95% para DBO). De modo geral, as lagoas produziram um efluente clarificado, sem a turbidez característica da presença de algas e sólidos em suspensão (MOHEDANO et al., 2012).

Nesses sistemas de tratamento, a biomassa é produzida em elevadas quantidades, podendo dobrar sua biomassa a cada 16-24 h, dependendo da disponibilidade de nutrientes, da temperatura e luminosidade (JOURNEY; SKILLICORN; SPIRA, 1993; PENG et al., 2007). Cheng et al. (2002b) relataram que a velocidade de crescimento de lemna cultivada em lagoas de efluentes provenientes da suinocultura pode chegar a 29 g (base seca) m⁻² dia⁻¹, o que significaria 106 ton (base seca) ha⁻¹ ano⁻¹ para o cultivo de lemna durante 365 dias ano⁻¹. Este rendimento é muito maior do que a maioria das culturas de amido, como milho (7,84 ton ha⁻¹ ano⁻¹), trigo (3,15 ton ha⁻¹ ano⁻¹) e cevada (3,70 ton ha⁻¹ ano⁻¹). No entanto, o seu crescimento 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. Por isso, dentre outros controles, a remoção periódica da biomassa excedente se faz necessária para melhorar a velocidade de crescimento (CULLEY; MYERS, 1978 *apud* FRANÇA et al., 2009). Esse excedente de biomassa geralmente é descartado, tornando-se um rico subproduto do tratamento de esgoto com potencial de reaproveitamento em diversas áreas.

2.2.3.2 Alimentação animal

O cultivo de lemnáceas é considerada uma tecnologia potencial para combinar o tratamento de efluentes e a produção de alimento animal, devido à baixa porcentagem de fibras e o elevado valor nutricional (IQBAL, 1999). 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 teores altos de proteína e baixo de fibras. Na Tabela 1 pode-se observar a variação da composição química das lemnáceas.

Tabela 1. Variação da composição química de lemnáceas em base seca.

Composição	g/100g
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). Diante dessas características, diversos pesquisadores testaram a eficiência das lemnas na alimentação de animais, principalmente aves e peixes (CULLEY et al., 1981; GAIGHER; PORATH; GRANTH, 1984; HASSAN, 1986; HASSAN; EDWARDS, 1992). A forma mais comum e difundida é para peixes, podendo a biomassa ser fornecida fresca, como único alimento, ou desidratada, em combinação com outras fontes de alimento em cultivos de carpas e tilápias (IQBAL, 1999).

2.2.3.3 *Produção de bioetanol*

O teor de amido nessas plantas pode variar de 3 a 75% por meio da manipulação das condições de crescimento, como, além da restrição de nutrientes, controles de pH, temperatura e fotoperíodo (LANDOLT; KANDELER, 1987; HASSAN; EDWARDS, 1992; CHENG; STOMP, 2009). Dentre outras características, essa possibilidade de acúmulo de amido pelas lemnas, tem despertado um grande interesse nos pesquisadores e nos governos, como China e EUA, sobre a produção de bioetanol a partir dessa planta (CHENG; STOMP, 2009; XU et al., 2011; CHEN et al., 2012; GE et al., 2012; HUANG et al., 2014; YIN et al., 2015; FUJITA et al., 2016).

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).

Essas plantas são consideradas como ideais por serem adaptáveis às mais variadas localidades e climas e não competirem com culturas alimentares e terras agriculturáveis. Elas possuem ainda velocidade de crescimento mais rápida do que outras plantas superiores, incluindo culturas agrícolas (LANDOLT; KANDELER, 1987). Podem também ser facilmente recuperadas do meio de cultura por um processo de separação simples (XU; SHEN, 2011), além de serem capazes de acumular amido (LANDOLT; KANDELER, 1987). Outra característica vantajosa é baixo teor de lignina presente na lemna, o que a torna uma fonte de celulose mais facilmente hidrolisável e, conseqüentemente, mais adequada para a conversão em bioetanol de segunda geração (JARVIS; FORSYTH; HENRY, 1988; HIMMEL et al., 2007; WALDRON, 2010).

A biomassa de lemna, portanto, possui duas frações carboidráticas, amilácea e celulósica. Vários pesquisadores têm concentrado esforços em aumentar o teor de amido nas lemnas para assim submetê-la ao processo de hidrólise e fermentação (CHENG; STOMP, 2009; TAO et al., 2013; XIAO et al., 2013; HUANG et al., 2014; SREE; APPENROTH, 2014). Outros pesquisadores têm investigado o uso da fração celulósica como fonte hidrolisável a etanol, com ou sem o uso de pré-tratamentos (ZHAO et al., 2012; ZHAO et al., 2015a; ZHAO et al., 2015b). De um modo geral, os pesquisadores vêm estudando três processos envolvidos na produção de etanol a partir da biomassa de lemna, sendo eles, o acúmulo de amido, a hidrólise enzimática com ou sem o uso de pré-tratamentos e a fermentação alcoólica.

2.2.3.3.1 Acúmulo de amido em lemnas

As plantas geram amido através da fotossíntese, sendo parte deste utilizado no metabolismo celular e o restante armazenado nos cloroplastos, sob a forma de grânulos de amido. À noite, sem fotossíntese, parte do amido é degradada e exportada a partir dos cloroplastos para o metabolismo heterotrófico. Sendo assim, para aumentar a geração de amido nas lemnas, pode-se estimular a fotossíntese ou diminuir a decomposição do amido armazenado. No entanto, para estimular a

fotossíntese é preciso aumentar a intensidade de iluminação e/ou a concentração de dióxido de carbono no meio, o que é difícil e tem alto custo, especialmente ao ar livre. Por outro lado, manipular as condições de cultivo (temperatura, nutrientes e inibidores) para inibir a decomposição do amido é relativamente fácil e menor custo do que estimular a fotossíntese (CUI; CHENG, 2015).

É reconhecido que a deficiência de nutrientes como fósforo, potássio, nitrogênio e fosfato pode desencadear o acúmulo de amido em lemna (REID; BIELESKI, 1970; EYSTER, 1978; THORSTEINSSON; TILLBERG, 1987; CIERESZKO; BARBACHOWSKA, 2000). Nestes casos, a deficiência de nutrientes pode conduzir a um reduzido uso de amido nas células, resultando no seu acúmulo (CUI; CHENG, 2015).

Cheng e Stomp (2009) estudaram o efeito da escassez de nutrientes em *Spirodela polyrhiza*. Os autores observaram que após 5 dias da transferência das lemnas frescas de uma solução rica em nutrientes para uma solução sem nutrientes, o teor de amido aumentou de 20 para 45,8% (base seca).

A privação de alguns nutrientes à lemna contribui para o acúmulo de amido, no entanto a exposição a outros, como o sódio, também pode contribuir para tal feito. Foi o que Xu et al. (2011) concluíram ao investigar o efeito da concentração de NaCl no acúmulo de amido em *Spirodela polyrhiza*. Após 4 dias de tratamento, os teores de amido em concentrações de 10, 20 e 30 mM de NaCl foram 13,4, 15,7 e 18,7% superiores ao controle sem NaCl no meio, respectivamente.

A temperatura e o fotoperíodo também interferem no acúmulo de amido em lemnas. Cui et al. (2011) estudaram o efeito da temperatura e do fotoperíodo em *Spirodela polyrhiza* submetida à escassez de nutrientes. O teor de amido na lemna cultivada a 5 °C foi 114% maior do que a cultivada a 25 °C. Com o aumento do fotoperíodo, o teor de amido aumentou em todas as temperaturas estudadas (5, 15 e 25 °C). Os resultados mostraram que as temperaturas amenas e o fotoperíodo longo, ou seja, maior tempo de exposição à luz, favoreceram o acúmulo de amido na lemna.

Além de experimentos de laboratório sob condições controladas, testes ao ar livre sob condições climáticas naturais foram realizados para avaliar o acúmulo de amido em lemnas. Xu et al. (2011) realizaram um estudo piloto em uma granja comercial de suínos em Zebulon, Carolina do Norte, EUA. Este foi o primeiro relatório sobre a produção de lemna enriquecida em amido no campo para converter a biomassa em etanol. Quando as plantas *S. polyrhiza* foram transferidas de águas residuais ricas em nutrientes para águas de poço, o teor de amido da lemna aumentou

64,9% (de 18,8 para 31,0% em base seca) em 10 dias. Farrell (2012) também cultivou lemna em uma lagoa e concluiu que o teor de amido poderia ser aumentado de 10 para 19% sob a restrição de nutrientes.

2.2.3.3.2 Hidrólise enzimática e fermentação

A fim de aumentar a produção de etanol a partir de lemna, além dos estudos sobre o acúmulo de amido, diferentes processos de hidrólise enzimática têm sido analisados para aumentar a liberação de açúcar, bem como o processo de fermentação simultâneo à hidrólise (SFS) a fim de obter melhores conversões a etanol.

Xu et al. (2011) investigaram a produção de *Spirodela polyrrhiza* enriquecida em amido para a sua conversão em bioetanol, como uma tecnologia complementar à produção de etanol à base de milho. Para a hidrólise enzimática utilizou-se α -amilase, pululanase e amiloglucosidase. O rendimento da hidrólise foi de 94,7% e a produção de etanol atingiu 97,8% do seu rendimento teórico. De acordo com os seus dados e métodos utilizados, um rendimento de amido de 9420 kg ha⁻¹ ano⁻¹ poderia ser alcançado através do cultivo de lemna submetida ao estresse de nutrientes, conduzindo a um rendimento de etanol de 6420 L ha⁻¹ ano⁻¹, cerca de 50% mais elevado do que o obtido utilizando milho.

Com o intuito de aumentar a eficiência da hidrólise do amido, enzimas auxiliares têm sido avaliadas na hidrólise da biomassa de lemna. Chen et al. (2012) utilizaram pectinase na hidrólise de *Landoltia punctata* e um aumento de 142% na produção de açúcares ocorreu em comparação ao processo que não a utilizou. A fermentação atingiu uma concentração de etanol de 30,8 g L⁻¹, um rendimento de 90,04% e 2,20 g L⁻¹ h⁻¹ de produtividade.

Além do processo de hidrólise enzimática, diferentes métodos de fermentação, como o SFS, têm sido estudados para a produção de etanol a partir da biomassa de lemna. Soda et al. (2015) avaliaram o processo de SFS em *Wolffia globosa* utilizando α -amilase, amiloglucosidase e levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*). A produção de etanol atingida foi de 170 g kg⁻¹ de biomassa seca.

Alguns pesquisadores têm explorado, além da fração amilácea, a fração celulósica da lemna com a presença e ausência de pré-tratamentos. Ge et al. (2012) avaliaram a produção de etanol a partir da espécie *Lemna minor* e utilizaram amilases e celulases para a hidrólise enzimática. Na ausência de pré-tratamentos, 96,2% (m m⁻¹) de glicose foi enzimaticamente liberada a partir de ambas frações, celulósica e amilácea da biomassa de lemna. O hidrolisado enzimático foi eficientemente

fermentado com um rendimento elevado de 0,485 g de etanol g⁻¹ de glicose.

Zhao et al. (2012) também avaliaram o uso de celulasas na hidrólise de lemna (*Lemna minor*) sem o uso de pré-tratamento. O teor de glicose foi de 25,4% (peso seco), oriunda da fração celulósica e não celulósica, incluindo o amido. A hidrólise se mostrou muito eficiente, sendo concluída em 8 h, usando celulase e beta-glucosidase. Em outro estudo, Zhao et al. (2015b) avaliaram o uso de pré-tratamento por explosão a vapor na biomassa de lemna. Na melhor condição de pré-tratamento (210 °C, 10 min) produziu-se a maior quantidade de material solúvel em água (70%), os maiores níveis de solubilização de amido (21%) e degradação da hemicelulose e pectina (60%). As concentrações de enzimas necessárias para a hidrólise reduziram-se em 5 vezes para a celulase e 50 vezes para a beta-glucosidase em comparação com a biomassa não pré-tratada.

Os resultados dessas pesquisas indicam que a biomassa de lemna pode produzir quantidades apreciáveis de amido e este pode ser hidrolisado e fermentado em etanol. Muito embora o amido seja o componente de maior interesse, a conversão da fração de celulose em etanol potencializa a utilização desta biomassa. Como se trata de uma espécie aquática, a pequena quantidade de lignina e a deficiência em hemiceluloses, a torna uma importante fonte de celulose fermentescível (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

A biomassa tem várias características que favorecem seu uso para a produção de etanol e que poderiam reduzir os custos globais quando comparada a outras matérias-primas, como por exemplo, o milho. Além das já citadas, velocidade de crescimento e capacidade de acumular amido que ocasionariam um rendimento de etanol 50% maior do que o alcançado pelo milho, a biomassa de lemna exige pouca ou nenhuma moagem, em função do seu pequeno tamanho e por ser uma biomassa hidratada (CHENG; STOMP, 2009). A ausência deste passo no preparo da biomassa para a fermentação se traduz em uma economia substancial em energia, um dos custos mais importantes na produção de etanol de milho (WHIMS, 2002).

As lemnas possuem ainda um teor de proteína entre 15 e 45% em relação ao teor de proteína de 9% do milho (LANDOLT; KANDELER, 1987). Isto sugere que a suplementação do mosto de levedura da fermentação com uma fonte de nitrogênio pode não ser necessário quando se utiliza a biomassa de lemna. Além disso, o subproduto extraído durante o processo de destilação pode ser uma alternativa economicamente viável

para a alimentação animal, superior em valor proteico ao DDG (do inglês, *dry distilled grain*) derivado do milho (CHENG; STOMP, 2009).

As matérias-primas convencionais utilizadas na produção de etanol têm alguns problemas inerentes, como impactos negativos sobre a segurança alimentar, meio ambiente e a insuficiência de terras agrícolas. Em contra partida, as lemnas são produzidas em superfícies de águas, principalmente as residuárias, contribuindo assim para o tratamento desses efluentes, além de excluir a necessidade de insumos agrícolas e evitar a concorrência com fontes de alimento e terras produtivas.

Vale ressaltar que a lemna produzida geralmente é um subproduto do tratamento de efluentes. Desta forma, tem-se uma oportunidade de reaproveitamento desta biomassa excedente, proporcionando uma destinação a esse rico subproduto e, ao mesmo, tempo contribuindo para alternativas energéticas complementares tão urgentes no cenário atual.

2.3 BIOMASSA AMILÁCEA

2.3.1 Aspectos gerais

O termo biomassa é usado para denominar qualquer matéria de origem vegetal que dispõe de bioenergia e que pode ser processada para fornecer formas bioenergéticas mais elaboradas e adequadas para o uso final (ZHANG; SMITH, 2007).

O milho e a mandioca são as matérias primas amiláceas mais empregadas para a produção de etanol. Os Estados Unidos são os maiores produtores de etanol a partir do milho e a Tailândia a partir de mandioca. A produção de etanol de matérias-primas amiláceas envolve o uso de enzimas amilolíticas para liquefação e sacarificação do amido, transformando-o em açúcares fermentescíveis para posterior processo de fermentação alcoólica (SAXENA; ADHIKARI; GOYAL, 2009).

2.3.2 Amido

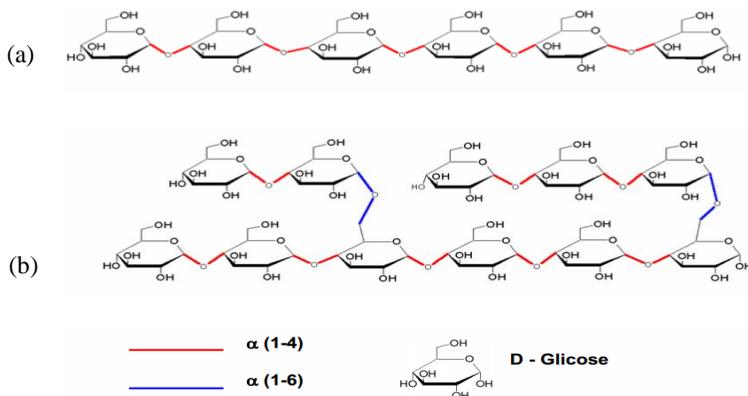
O amido é o polissacarídeo de reserva mais importante em plantas superiores e o mais abundante na natureza, só competindo em quantidade com a celulose (SINGH et al., 2003). Depois dos açúcares mais simples (glicose, frutose, sacarose e maltose), é o principal carboidrato que os vegetais superiores sintetizam a partir da fotossíntese (FRANCO et al., 2002).

Esse polissacarídeo é formado nos plastídios das plantas e sintetizado nas folhas, onde serve como carboidrato de reserva temporário, acumulando-se nos cloroplastos durante o dia e servindo como fonte principal para a síntese de sacarose citosólica durante a noite (TESTER; KARKALAS; QI, 2004; VANDEPUTTE; DELCOUR, 2004).

Em termos estruturais, o amido se apresenta na forma de grânulos, que se diferem 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). É um polímero composto por dois tipos de macromoléculas: a amilose e a amilopectina. A amilose é composta de unidades de glicose polimerizadas por ligações glicosídicas α -1,4, de forma linear (Figura 4 a). 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 4 b) 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. Tais características são particulares à fonte botânica a qual o amido é extraído. Normalmente os amidos contêm 15 a 30% de amilose e 70 a 85% de amilopectina (JANE et al., 1994).

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



Fonte: Adaptado Franco et al. (2002).

2.3.3 Hidrólise enzimática do amido

O amido, além de ser utilizado como fonte de energia, é largamente empregado pela indústria de alimentos como ingrediente em sistemas alimentícios. Mas nem sempre o amido, na sua forma nativa, possui as propriedades físico-químicas adequadas a determinados tipos de processamento. Desde modo, a hidrólise enzimática tem sido utilizada como técnica que possibilita a transformação do amido infermentescível em açúcares fermentescíveis, os quais podem ser convertidos em diversos produtos de interesse, entre estes, o álcool etílico (LIMA et al., 2002; SERRANO; FRANCO, 2005).

A hidrólise enzimática do amido acontece pelo desdobramento total das moléculas de amilose e amilopectina que, ao se romper as ligações glicosídicas, transformam-se em dextrinas cada vez mais simples e finalmente em glicose. O fato das ligações glicosídicas do amido serem do tipo α (alfa), desperta 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., 2002; 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, sendo o resultado dessa segunda etapa uma solução de sacarídeos de baixo peso molecular, como glicose e maltose (MAAREL et al., 2002).

2.3.3.1 Enzimas amilolíticas

As enzimas amilolíticas são catalisadoras da hidrólise de ligações dos tipos α -1,4 e α -1,6, encontradas nos polissacarídeos, recebendo a denominação de amilases. Elas hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e regressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose. Essas enzimas apresentam grande importância em biotecnologia com aplicações nas indústrias de alimentos, fermentação, têxtil e de papel. Apesar das amilases serem derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e micro-organismos, as enzimas microbianas geralmente encontram grande demanda industrial. Grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005).

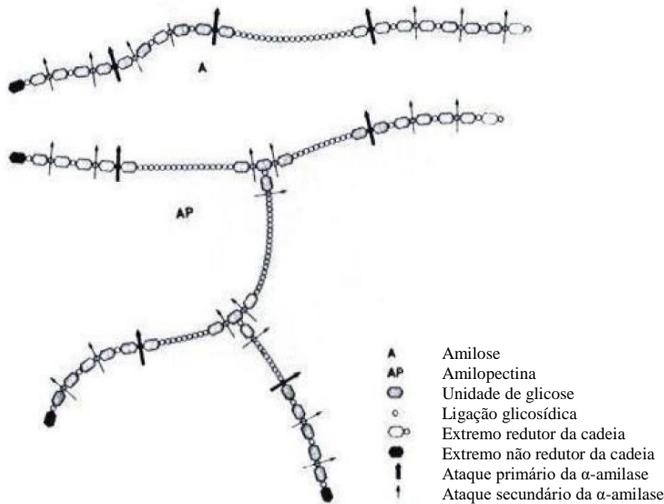
Na hidrólise do amido são utilizados, basicamente, quatro grupos de enzimas. As endoamilases e exoamilases que agem primeiramente nas ligações α -1,4; as desramificantes que agem exclusivamente nas ligações α -1,6 e as transferases que quebram ligações glicosídicas α -1,4 e as transferem para um receptor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

2.3.3.1.1 α -Amilases

A α -amilase rompe as ligações α -1,4, ao acaso dentro da molécula de amido. 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 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, esta enzima é comumente denominada de enzima liquidificante (MENEZES, 1980).

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 5).

Figura 5. Ação da enzima α -amilase sobre as frações do amido, amilose e amilopectina.



Fonte: Bruchmann (1990).

Essa enzima pode ser produzida por diversas espécies de micro-organismos, mas para aplicações comerciais, a α -amilase derivada principalmente do gênero *Bacillus*, tem encontrado aplicação potencial numa variedade de processos industriais (PANDEY et al., 2000a; KONSOLA; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2007). Isso porque, estas enzimas têm apresentado uma estabilidade térmica notável (PRAKASH; JAISWAL, 2010), característica desejável, visto que a etapa de liquefação do amido é realizada a altas temperaturas (ASGHER et al., 2007).

2.3.3.1.2 Amiloglucosidase

A amiloglucosidase é uma enzima extracelular 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 (LIN; FELDBERG; CLARK, 1993; PANDEY et al., 2005).

Em processos de degradação de polissacarídeos, geralmente é utilizada uma endoenzima, a α -amilase, associada à amiloglucosidase. Na hidrólise, espera-se que as primeiras formem moléculas menores de substrato facilitando assim a ação da amiloglucosidase (CABELLO,

1995). Portanto, a amiloglucosidase é utilizada em amidos liquefeitos com α -amilase para gerar produtos que serão usados como substratos para fermentações, ou para a obtenção biotecnológica de glicose e dextrinas.

As amiloglucosidases 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 micro-organismos, incluindo bactérias e fungos, sendo as enzimas usadas comercialmente são produzidas por espécies de *Aspergillus* e *Rhizopus* (DELGADO; CASTRO; VÁZQUEZ, 2009).

2.3.3.2 Enzimas complementares – Pectinases

As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pécicas. Essas substâncias 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).

O uso de pectinases tem o intuito de destruir a integridade estrutural da matriz responsável pelo aprisionamento dos grânulos, expondo e liberando o amido (UENOJO; PASTORE, 2007). Portanto, o seu uso como enzimas complementares no processo de hidrólise do amido advém como uma alternativa para aumentar o rendimento do processo (LEONEL; CEREDA, 1998).

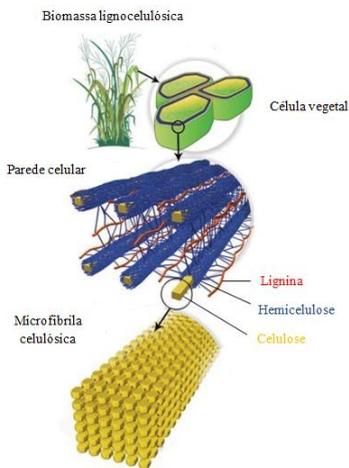
2.4 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

2.4.1 Aspectos gerais

A biomassa lignocelulósica constitui o material mais abundante em nosso planeta, tornando-se uma potencial fonte sustentável de açúcares para a conversão em bioetanol e outros produtos com alto valor (PERLACK et al., 2005; BALAT; BALAT; ÖZ, 2008). Os materiais lignocelulósicos compõem as paredes celulares da maioria das plantas lenhosas, sendo formados, majoritariamente, pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose, entremeados por outra macromolécula formada por álcoois aromáticos, a lignina (LEE, 1997).

Os polissacarídeos da parede celular estão localizados em duas interfaces, a microfibrilar e a matricial. A interface microfibrilar possui alto grau de cristalinidade e composição química homogênea. Esta estrutura é constituída basicamente de microfibrilas de celulose, normalmente arranjadas em padrão helicoidal, ordenadas em estruturas longas e finas, unidas por pontes de hidrogênio (ROLAND; REIS; VIAN, 1992). Juntamente ao longo das microfibrilas de celulose estão os polissacarídeos não-celulósicos ou hemicelulósicos, localizados em zonas amorfas sem orientação regular (Figura 6) (CARPITA; GIBEAUT, 1993; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Figura 6. Estrutura dos principais constituintes da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado Kondo (1997).

A celulose, hemicelulose e lignina representam mais de 90% da massa seca da biomassa, geralmente, na proporção de 38-50% (m m^{-1}) de celulose, 23-32% (m m^{-1}) de hemicelulose e 12-25% (m m^{-1}) de lignina (PANDEY et al., 2000b; MAMMAN et al., 2008; BRANDT et al., 2013). As proporções destes componentes variam de espécie para espécie e também sofrem significativas alterações durante o ciclo de vida do vegetal (RAVEN et al., 2001). Em menores proporções, e dependendo da origem do vegetal, também podem ser encontrados resinas, ácidos graxos, fenóis, taninos, compostos nitrogenados e sais minerais, principalmente, de cálcio, potássio e magnésio (NEUREITER et al., 2002).

Do ponto de vista tecnológico, os carboidratos na forma de frações celulósicas (glicose) e hemicelulósicas (fucose, arabinose, galactose, glicose, xilose e manose) representam os substratos que podem ser convertidos em bioprodutos. Entretanto, a complexidade das interligações das três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina) é tal que impõe dificuldades para a recuperação dos açúcares constituintes na forma de monômeros (SUN; CHENG, 2002).

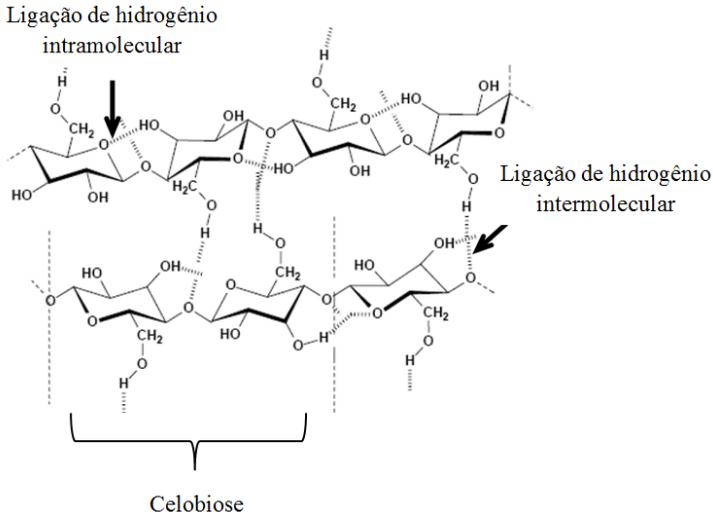
Desta maneira, faz-se necessário conhecer a estrutura e as principais características dos principais componentes da biomassa lignocelulósica: celulose, hemicelulose e lignina.

2.4.2 Celulose

A celulose, encontrada na parede celular das plantas, é a biomolécula mais abundante na natureza (FESTUCCI-BUSELLI; OTONI; JOSHI, 2007). Sua molécula consiste em um homopolissacarídeo linear, de 10 a 15 mil unidades de β -D-glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 carbono-carbono e por ligações de hidrogênio intramoleculares (ligações entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002; ARANTES; SADDLER, 2010). Na estrutura da celulose, dois monômeros de glicose adjacentes são ligados pela eliminação de uma molécula de água, esta ligação química dá origem à molécula de celobiose, a qual é a unidade repetitiva da celulose (Figura 7) (FENGEL; WEGENER, 1989).

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).

Figura 7. Estrutura química da celulose.



Fonte: Morais (2005).

A resistência à tensão da celulose tem feito dela uma substância muito útil para as civilizações através dos milênios. Muitos produtos manufaturados, incluindo o papel, papelão, placas de isolamento e outros materiais de empacotamento e construção, são derivados da celulose (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

Ao mesmo tempo, estas características, juntamente com o envoltório de lignina, conferem à macromolécula celulose grande resistência à hidrólise, o que representa um desafio para a utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas, como a produção de etanol de segunda geração (ARANTES; SADDLER, 2010).

2.4.3 Hemicelulose

As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, mas concentram-se, principalmente, nas camadas primária e secundária, onde estão intimamente associadas à celulose e lignina. Cerca de 30% dos polissacarídeos que constituem a parede celular dos vegetais referem-se à hemiceluloses sendo este, portanto, um carboidrato abundante na natureza (HON; SHIRAIISHI, 1991; DA SILVA et al., 1997).

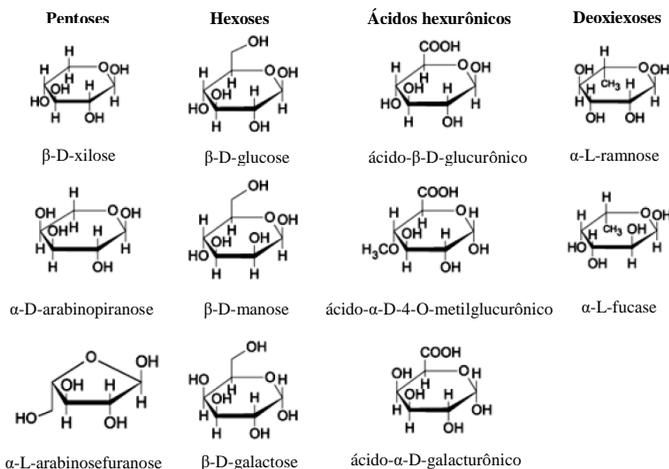
Diferentemente da celulose, as hemiceluloses são um grupo de heteropolissacarídeo com cadeias menores e com muitas ramificações (cadeias laterais). As cadeias hemicelulósicas são formadas por diversos grupos de polissacarídeos, principalmente aldopentoses, como xilose e arabinose, e aldohexoses, como glicose, manose e galactose. Esta macromolécula contém ainda, ácidos hexurônicos, como os ácidos β -D-glucurônico, D-4-O-metilglucurônico e β -D-galacturânico, e deoxixoses (Figura 8) (HOLTZAPPLE, 1993; KOOTSTRA et al., 2009).

As hemiceluloses estão associadas às microfibrilas de celulose por pontes de hidrogênio, e promovem a união das microfibrilas de celulose adjacentes. Esta interação parece estar relacionada com as propriedades mecânicas da parede celular (HAYASHI; MACLACHLAN, 1984; HAYASHI; MARSDEN; DELMER, 1987; FRY, 1988; HAYASHI, 1989; WHITNEY et al., 1995; WHITNEY et al., 1999). As hemiceluloses diferem da celulose principalmente por sua constituição em diferentes unidades de açúcares e também pela sua estrutura física. Por serem totalmente amorfas, as hemiceluloses apresentam, portanto, maior susceptibilidade ao ataque de agentes químicos (FENGEL; WEGENER, 1989).

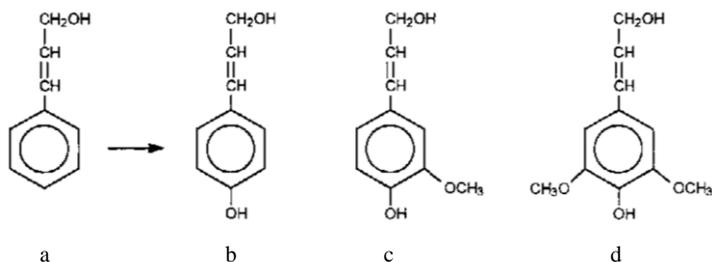
2.4.4 Lignina

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante na superfície terrestre, sendo superada apenas pela celulose. Nas plantas, a lignina está presente principalmente na lamela média e na parede secundária, conferindo rigidez à parede das células graças ao seu caráter fenólico que forma uma estrutura rígida e hidrofóbica. Estas características são importantes para o suporte mecânico e, provavelmente, permitiram uma melhor adaptação das plantas superiores. A complexidade deste polímero na célula permite a alta eficiência na condução de água, nutrientes e metabólitos, bem como, na defesa contra patógenos (BRISTOW; KOLSETH, 1986; FRY, 1988; TERASHIMA et al., 1993; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

A estrutura química da lignina é formada por diferentes combinações dos grupos *p*-hidroxi-fenil (*H*), guaiacil (*G*) e siringil (*S*), tendo como precursores os álcoois cumárico, coniferílico e sinapílico (Figura 9) (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 8. Componentes da fração hemicelulose.

Fonte: Morais (2005).

Figura 9. Derivados do álcool cinâmico (a): álcool trans-p-cumárico (b), álcool trans-coniferílico (c) e álcool trans-sinapílico (d).

Fonte: Fengel e Wegener (1989).

No complexo polimérico da lignina ocorre uma variedade de ligações, incluindo éster, éter e carbono-carbono. A ligação éter é dominante representando, aproximadamente, 2/3 das ligações, sendo o restante das ligações do tipo carbono-carbono e éster (BOLWELL, 1993; SJOSTROM, 1993; BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003; BOUDET, 2003). Como resultado destas ligações, ocorre a formação de uma complexa rede tridimensional hidrofóbica, com importantes ligações covalentes e não covalentes com a celulose e as hemiceluloses, em

particular com as cadeias de xilanas (LAWOKO et al., 2005; LAWOKO et al., 2006).

Desta forma, apesar de sua estrutura não estar relacionada a moléculas simples de açúcar, a lignina desempenha um papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise, uma vez que dificulta o acesso à celulose (LEMOS, 2001).

2.5 PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

2.5.1 Aspectos gerais

O processo de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica demanda a transformação da celulose em monômeros de glicose e subsequente conversão dos mesmos, por micro-organismos, em etanol. Entretanto, a celulose nativa encontra-se muito protegida pela matriz lignina-carboidrato, de modo que a celulose torna-se recalcitrante à ação hidrolítica, resultando em processos lentos de conversão. Portanto, se faz necessário realizar um pré-tratamento dessa biomassa de modo a aumentar a exposição das fibras de celulose, tornando-a mais acessível aos agentes hidrolíticos enzimáticos ou ácidos. Desta forma, a conversão da celulose em etanol de segunda geração requer um processo que compreende geralmente três etapas: pré-tratamento, hidrólise (ácida ou enzimática) dos polímeros, seguido da fermentação dos monômeros (glicose) em etanol (LOHMEIER-VOGER; SOPHER; LEE, 1998; SUN; CHENG, 2002).

2.5.2 Pré-tratamento

2.5.2.1 Aspectos gerais

A conversão da maioria dos materiais lignocelulósicos a etanol a partir da celulose requer pré-tratamento antes da etapa de hidrólise. Isso porque a presença de lignina e hemicelulose nestes materiais, muitas vezes, limita a utilização integral das moléculas de celulose (glicose). Portanto, é necessário que a etapa de pré-tratamento remova eficientemente estes interferentes (RAMOS, 2003; SUN; CHENG, 2005).

Os principais objetivos do pré-tratamento são dissociar o complexo lignina-celulose-hemicelulose, reduzir o grau de cristalinidade da

celulose e aumentar a área superficial da biomassa (HSU, 1996; SUN; CHENG, 2005).

O pré-tratamento deve ainda evitar a degradação ou perda de carboidratos maximizando os rendimentos em açúcares e evitar ou minimizar a formação de compostos inibidores do processo tanto na etapa de hidrólise quanto na etapa de fermentação (HSU, 1996; SUN; CHENG, 2005). O processo de pré-tratamento de uma biomassa lignocelulósica consiste em uma das etapas operacionais mais relevantes em termos de custo direto, além de influenciar consideravelmente os custos das etapas anteriores e subsequentes do processo (LEE et al., 1994; LYND; ELANDER; WYMAN, 1996; MOSIER et al., 2003a; MOSIER et al., 2003b).

De modo geral, o pré-tratamento deve ser muito eficiente em termos de rendimento, seletividade, funcionalidade (garantindo acessibilidade da celulose aos agentes hidrolíticos), simplicidade operacional, segurança, higiene industrial e atributos ambientais, enquanto consiste em reduzido consumo de insumos químicos, energia e utilidades (BAUDEL, 2006). Neste sentido, diversas pesquisas têm desenvolvido diferentes tipos de pré-tratamentos a fim de otimizar a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica (MAES; DELCOUR, 2001; CARRILHO et al., 2005; KIM; HOLTZAPPLE, 2005; OHGREN; GALBE; ZACCHI, 2005; TEYMOURI et al., 2005; LIAO et al., 2006; XU et al., 2006; CARA et al., 2008; RABELO; FILHO; COSTA, 2008).

Os métodos de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas podem ser classificados, em relação a sua natureza, em três grupos principais: físicos, químicos, biológicos, além de uma possível combinação entre eles (SUN; CHENG, 2002; MOSIER et al., 2005). Na Tabela 2, pode-se observar alguns métodos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.

2.5.2.2 Pré-tratamento Hidrotérmico

Nos últimos anos houve um grande interesse do meio científico no uso da água, submetida a elevadas temperatura e pressão, servindo como solvente presente no meio reacional, em processos de conversão da biomassa lignocelulósica. Esse tipo de pré-tratamento tem sido chamado de hidrotérmico, auto-hidrólise, fracionamento aquoso ou fracionamento a vapor (YUAN et al., 2011).

Tabela 2. Métodos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos para hidrólise enzimática.

Métodos	Operações (fatores) que ocasionam mudança na estrutura do substrato	Tipo de mudança
Físico	Moagem e trituração (bola, energia vibratória, rolo duplo, pressão, martelo); radiação (raios de elétrons, raios γ , micro-ondas); altas temperaturas (pirólises, explosão a vapor)	Aumento da área superficial e tamanho dos poros da partícula, diminuição do grau de polimerização
Químico	Bases, ácidos, gases, agentes oxidantes e redutores, solventes orgânicos	Deslignificação, diminuição do grau de polimerização e cristalinidade da celulose associada com o inchaço da amostra, aumento da porosidade
Biológico	Fungos de podridão branca (<i>Pleurotus</i> , <i>Pycnoporus</i> , <i>Ischnoderma</i> , <i>Phlebia</i> , etc)	Deslignificação e redução do grau de polimerização da celulose e hemicelulose
Combinado	Tratamento alcalino associado com explosão a vapor, moagem acompanhada com tratamento alcalino ou tratamento ácido	Degradação da hemicelulose, deslignificação, aumento da área superficial e tamanho dos poros

Fonte: Szczodrak e Fiedurek (1996).

No processo hidrotérmico, a água sob elevada pressão pode penetrar na estrutura celular da biomassa, hidratar a celulose e remover a hemicelulose. O pKa da água é afetado pela temperatura de tal maneira que o pH da água pura passa de 7,0 (a 25 °C) para próximo de 5,0 (a 200 °C) (ALLEN et al., 2001). Isso faz com que o pré-tratamento hidrotérmico promova a clivagem das ligações dos complexos lignina-carboidrato, com a ruptura das ligações glicosídicas dos polissacarídeos, principalmente das hemiceluloses. O ácido acético formado a partir da desacetilação parcial da fração hemicelulósica atuará como catalisador da reação da hidrólise da biomassa promovendo a despolimerização da hemicelulose (processo autocatalítico). Em temperaturas na faixa entre 180 a 220 °C e em curtos períodos de reação, além de a fração

hemicelulósica poder ser dissolvida em água durante ou após o pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos, dependendo do grau de condensação do vapor, diferentes quantidades de lignina podem ser extraídas com água e o grau de polimerização da celulose pode diminuir com o aumento do tempo e da temperatura de reação (BOBLETER, 1994).

Este método tem sido largamente utilizado em escala piloto, por exemplo, no NREL em Golden, Co (EUA), na Sekab em Ornskoldsvik (Suécia), na Iogen, em Ottawa (Canadá), sendo considerado como um dos pré- tratamento mais promissor (GALBE; ZACCHI, 2010). Vários estudos foram realizados utilizando esse método em diferentes biomassas, tais como a palha de trigo (KABEL et al., 2007), a palha de milho (OHGREN et al., 2007), o bagaço de cana (LASER et al., 2002) e a madeira (SODERSTROM et al., 2004). Este interesse se justifica pelas seguintes vantagens que o método hidrotérmico apresenta, o processo não faz uso de reagentes químicos, sendo interessante do ponto de vista ambiental e econômico, além de não ter necessidade de trabalhar com reatores altamente resistentes a corrosão; hidrolisa grande parte da fração hemicelulósica; provoca alterações físico-químicas na celulose e lignina favorecendo a maior eficiência de hidrólise (GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJO, 1999).

Uma abordagem comum para avaliar a intensidade do pré-tratamento hidrotérmico é o emprego do chamado fator severidade, o qual é definido por Overend, Chornet e Gascoigne (1987) pela Equação 1:

$$\log(r_0) = \log[t \times \exp((T - 100)/14,75))] \quad (1)$$

Onde t é o tempo de residência em (min) e T é a temperatura em ($^{\circ}\text{C}$). Os resultados são geralmente apresentados como uma função de $\log(r_0)$, e as condições ótimas correspondentes a uma faixa restrita de $\log(r_0)$. Uma vez que r_0 depende da temperatura e do tempo, este fator pode ser usado para medir o efeito combinado de ambas as variáveis em um dado tratamento. O fator severidade tem sido utilizado por vários pesquisadores que trabalham com pré- tratamento hidrotérmico de diversas biomassas (BOBLETER, 1994; KABEL et al., 2007; SCHACHT; ZETZL; BRUNNER, 2008).

2.5.3 Hidrólise enzimática da biomassa

2.5.3.1 Aspectos gerais

Após a etapa de pré-tratamento, a hidrólise da biomassa lignocelulósica se faz necessária para obtenção de açúcares fermentescíveis. Existem basicamente três técnicas para a obtenção desses açúcares: hidrólise com ácido concentrado, hidrólise com ácidos diluídos e hidrólise enzimática.

As rotas enzimáticas apresentam vantagens importantes sobre as rotas químicas, como especificidade de reação, ausência de reações secundárias, ausência de formação de inibidores fermentativos e baixas temperaturas e pressão (BASTOS, 2007). As conversões enzimáticas aparecem como opções promissoras, em virtude da possibilidade de atingir rendimentos glicosídicos próximos ao teórico, além do fato de se poder contar com as técnicas modernas de microbiologia e engenharia genética, com vistas à otimização das etapas do processo integrado. Um grande desafio consiste em tornar o processo enzimático viável economicamente, de modo que a produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas torne-se competitiva com as demais rotas de produção de biocombustíveis em larga escala (RABELO, 2010).

2.5.3.2 Hidrólise enzimática da celulose

A hidrólise enzimática da celulose é catalisada pelas enzimas celulasas. Trata-se de um complexo enzimático de alto grau de sinergismo, representado pelas endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases.

As enzimas endoglucanases são responsáveis por iniciar a hidrólise. Elas realizam quebras aleatórias nas regiões amorfas internas da cadeia de celulose, gerando oligossacarídeos de vários comprimentos (BOISSET et al., 2000). Consequentemente, geram-se novos terminais, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente) (CASTRO; PEREIRA, 2010).

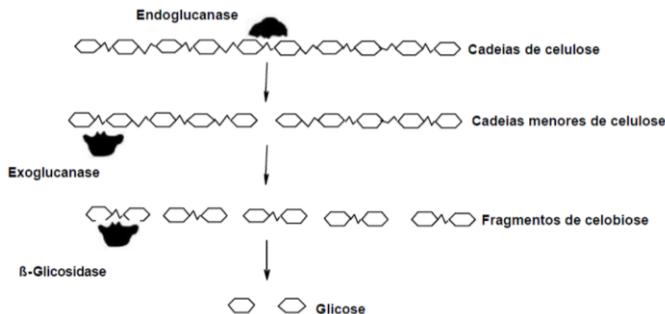
Os produtos gerados pelas endoglucanases tornam-se então substratos para as exoglucanases, as quais clivam os oligossacarídeos, liberando principalmente celbiose (ROUVINEN et al., 1990; DAVIES; HENRISSAT, 1995; HENRISSAT; TEERI; WARREN, 1998).

Ocasionalmente, glicose e celotriose são produzidas em pequenas quantidades durante o estágio inicial da hidrólise (DIVNE et al., 1994).

As β -glucosidases hidrolisam celobiose e removem glicose de terminais não redutores de pequenas celodextrinas (BHAT; BHAT, 1997). Sendo assim, as β -glucosidases exercem um importante papel na hidrólise, impedindo o acúmulo da celobiose, que se trata de um potente inibidor do processo (SUN; CHENG, 2002).

Desta forma, as celulases atuam em sinergia para hidrolisar a celulose criando sítios acessíveis umas às outras e aliviando problemas de inibição pelos próprios produtos, como pode ser visto de forma simplificada na Figura 10 (ERIKSSON; KARLSSON; TJERNELD, 2002; VIALJAMAE et al., 2003).

Figura 10. Ação das celulases sobre a molécula de celulose.



Fonte: Modificado de Wright, Wyman e Grochmann (1988).

Muitos fatores podem afetar a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, fatores referentes ao substrato como concentração, cristalinidade da celulose, grau de polimerização da celulose, área superficial e teor de lignina. E fatores referentes às enzimas, como concentração de celulase; inibição retroativa devido ao acúmulo de glicose e celobiose no meio reacional e desnaturação térmica das enzimas (SUN; CHENG, 2002; ANDERSEN, 2007).

Devido ao seu grande potencial de evolução, muitos especialistas veem a hidrólise enzimática como a chave para a produção de bioetanol de segunda geração a um custo competitivo em longo prazo (PHILIPPIDIS; SMITH, 1995; LYND et al., 2002).

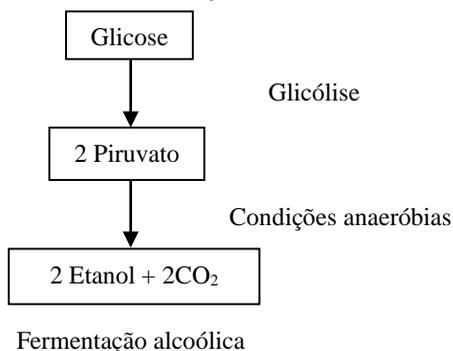
2.5.4 Fermentação alcoólica

2.5.4.1 Aspectos gerais

A fermentação alcoólica caracteriza-se como uma via catabólica, na qual há degradação de moléculas de açúcar (glicose ou frutose), no interior da célula de micro-organismos (levedura ou bactéria), até a formação de etanol e CO_2 , havendo liberação de energia química e térmica (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

Na fermentação alcoólica, o piruvato é descarboxilado, formando acetaldeído e, posteriormente, reduzido a etanol (Figura 11) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

Figura 11. Catabolismo da fermentação alcoólica.

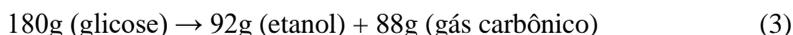


Fonte: Lehninger, Nelson e Cox (2006).

A equação global da fermentação alcoólica pode ser observada na Equação 2.



O balanço de massa teórico indica que 1 mol de glicose é convertido a 2 moles de etanol e 2 moles de gás carbônico. O rendimento teórico é de 51,1 % sobre a massa da glicose (Equação 3).



2.5.4.2 Processos de fermentação alcoólica SHF e SFS

A fermentação alcoólica pode ocorrer basicamente por dois processos, separada da hidrólise (SHF), ou simultânea à hidrólise (SFS).

A grande vantagem do método SHF é a possibilidade de conduzir a hidrólise e a fermentação em suas condições ótimas, já que os processos ocorrem em momentos e em reatores distintos. A temperatura ótima para as celulasas está entre 45 e 50 °C e a temperatura ideal para a fermentação está entre 30 e 37 °C (OLSSON et al., 2006). Porém, apresenta a desvantagem do acúmulo de açúcares intermediários da hidrólise, causando inibição às enzimas do complexo celulásico, e redução na conversão final de glicose, assim como a possibilidade de contaminação devido ao tempo longo da hidrólise e a solução de açúcares disponível ao ataque de micro-organismos indesejados (CASTRO; PEREIRA, 2010).

O processo SFS necessita de menor custo de investimento na planta (projeto), visto que nele são agrupadas duas etapas em um mesmo reator. Neste processo, as enzimas são menos passíveis de inibição pelos produtos da hidrólise, pois a glicose liberada é concomitantemente fermentada. A manutenção de uma baixa concentração de glicose no meio também favorece o equilíbrio das demais reações de hidrólise, no sentido de formação de mais produto, além de reduzir riscos de contaminação no sistema (McMILLAN et al., 1999; CASTRO; PEREIRA, 2010). A presença de etanol no meio reacional também propicia uma mistura menos vulnerável à ação de micro-organismos indesejáveis e permite uma diminuição do stress osmótico inicial para a levedura (BOTHAST; SCHLICHER, 2005).

Entretanto, estes processos são conduzidos fora das condições ótimas de operação das enzimas, de modo que um ganho de rendimento devido à menor inibição enzimática pode ser contrabalançado por uma menor atividade das enzimas em razão das condições operacionais menos apropriadas à atividade catalítica. Micro-organismos termotolerantes têm sido propostos para serem usados neste processo, pois seria possível aproximar a temperatura do processo à temperatura ótima de atividade das celulasas. Apesar de algumas desvantagens, este tem sido o método preferido tanto em estudos de laboratório quanto em escala piloto (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

2.5.4.3 Leveduras para a fermentação

Para selecionar o agente biológico da fermentação alcoólica deve-se levar em consideração as seguintes propriedades: elevada atividade, ou seja, ser capaz de converter rapidamente o substrato em produto com altos rendimentos, conduzindo a altos valores de produtividade; estabilidade sob condições ambientais extremas (elevada pressão osmótica do meio, elevada temperatura, elevada força iônica), devendo, ainda, ser tolerante e resistente a substâncias tóxicas, que podem ser geradas no processo de tratamento da matéria-prima ou encontradas em resíduos e efluentes (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008)

A espécie mais importante de levedura para a fermentação é a *Saccharomyces cerevisiae*, que por meio de seu emprego intensivo em fermentação industrial, já passou por um processo de seleção natural, apresentando os melhores desempenhos em conversão de glicose a etanol, produtividade, tolerância alcoólica, resistência e robustez a inibidores, além de não exibir muitas limitações fermentativas presentes nas bactérias. Desde que os impactos negativos dos inibidores sejam controlados, a fermentação acontece sem maiores problemas (BETTIGA; HAHN-HÄGERDAL; GORWA-GRAUSLUND, 2008; MATSUSHIKA et al., 2009).

2.6 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

A crescente demanda por energia e o inevitável esgotamento dos combustíveis fósseis tem estimulado a exploração por novas fontes alternativas de energia. Neste contexto, a lemna tem despertado grande interesse de pesquisadores e governos para a produção de bioenergia, como o etanol.

O uso da lemna para a produção de etanol tem apresentado vantagens como alta velocidade de crescimento da biomassa, capacidade de acumular amido, facilidade de hidrólise da fração celulósica e não competição por áreas agrícolas.

No entanto, poucos trabalhos têm sido apresentados na literatura no que se refere à hidrólise simultânea do amido e da celulose de lemna. Além disso, inexistem trabalhos referentes à sacarificação e fermentação simultânea para a produção de etanol a partir da espécie *Landoltia punctata* submetida ao pré-tratamento hidrotérmico.

Este fato, aliado à fundamentação teórica apresentada neste capítulo, permite justificar plenamente a realização deste trabalho, cujo

maior objetivo reside no estudo da produção de etanol a partir de lemna. Esse trabalho foi dividido em duas partes distintas e independentes. A primeira parte, contemplada no Capítulo 3, estudou a capacidade da lemna em acumular amido e avaliou a hidrólise enzimática simultânea da fração amilácea e celulósica. No Capítulo 4 encontra-se a segunda parte desse trabalho. Ela foi realizada durante o doutorado sanduíche na Inglaterra e investigou o processo de fermentação e sacarificação simultânea da fração celulósica da biomassa de lemna com o uso de pré-tratamento hidrotérmico. Desta forma, esse trabalho foi realizado a fim de disponibilizar dados importantes e inéditos para a viabilização da produção de etanol de lemnas.

CAPÍTULO 3 – ÁCUMULO DE AMIDO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE LEMNA (*Landoltia punctata*) SEM PRÉ-TRATAMENTO

3.1 INTRODUÇÃO

A limitação do fornecimento de combustíveis fósseis aliada às crescentes preocupações com a questão ambiental tem impulsionado o desenvolvimento de processos industriais a base de energia renovável. Nesse sentido, os biocombustíveis surgem como uma alternativa promissora de recurso energético mundial.

Algumas pesquisas estão focadas na exploração de biomassa lignocelulósica como fonte para a produção de biocombustível, seja a partir de culturas não alimentares ou resíduos provenientes da agricultura (biocombustíveis de segunda geração). Os biocombustíveis de segunda geração atualmente não são rentáveis, em grande parte, devido à natureza de proteção da lignina que reduz a acessibilidade das celulasas a celulose. Com efeito, menos de 20% da celulose em biomassa nativa pode ser enzimaticamente sacarificada a menos que pré-tratamentos eficazes e de elevada intensidade energética sejam efetuados (HIMMEL et al., 2007; WALDRON, 2010).

Sendo assim, a busca por uma biomassa com grande potencial para a produção de biocombustível é muito importante para aumentar a rentabilidade do processo. Nesse contexto, a lemna tem sido relatada como uma matéria-prima promissora para tal feito. Essas plantas aquáticas são consideradas como ideais por serem adaptáveis às mais variadas localidades e climas e não competirem com culturas alimentares e terras agrícolas. Elas possuem ainda velocidade de crescimento maior que outras plantas superiores, elevada proporção de hidratos de carbono e baixo teor de lignina, o que a torna uma fonte de celulose mais facilmente hidrolisável e, conseqüentemente, mais adequada para a conversão em bioetanol de segunda geração (LANDOLT; KANDELER, 1987; JARVIS; FORSYTH; HENRY, 1988; HIMMEL et al., 2007; WALDRON, 2010).

Além disso, as lemnas, sob condições manipuladas de crescimento, são capazes de acumular amido, como por exemplo, sob a escassez de nutrientes (REID; BIELESKI, 1970; EYSTER, 1978; LANDOLT; KANDELER, 1987; THORSTEINSSON; TILLBERG, 1987; CIERESZKO; BARBACHOWSKA 2000). Pesquisadores têm concentrado esforços em maximizar o teor de amido nas lemnas e valores

entre 20 a 45% têm sido relatados (CHENG; STOMP, 2009; FARRELL, 2012; TAO et al., 2013; XIAO et al., 2013; HUANG et al., 2014; SREE; APPENROTH, 2014).

Em relação à hidrólise enzimática da lemna, taxas consideráveis de conversão do amido têm sido alcançadas seguindo diferentes tratamentos enzimáticos (CHENG; STOMP, 2009; CHEN et al., 2012). Bons rendimentos de glicose também foram atingidos a partir da fração celulósica usando um *mix* de celulases sem o uso de pré-tratamento (ZHAO et al., 2012). No entanto, pouca investigação sobre a hidrólise enzimática simultânea da fração amilácea e da fração celulósica é apresentada na literatura.

Nesse sentido, este capítulo trata da hidrólise enzimática simultânea da fração amilácea e celulósica de lemna (*Landoltia punctata*) sem o uso de pré-tratamento.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O esquema geral desta etapa do trabalho pode ser visualizado na Figura 12.

3.2.1 Matéria-prima

A espécie de lemna utilizada neste estudo foi *Landoltia punctata* (ver item 2.2.2), excedente de uma unidade piloto de tratamento de esgoto sanitário oriundo de condomínios residenciais. Essa unidade se localiza no setor experimental do Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU) e Laboratório de Resíduos Sólidos (LARESO), do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENS), nas dependências do Campus Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, na cidade de Florianópolis (SC).

A unidade piloto foi descrita por Teles (2016) da seguinte forma: *“o esgoto era armazenado em dois tanques de estocagem e aplicado no tanque de equalização seguido por duas lagoas com lemnas, em série, semienterradas. Os tanques de estocagem, o tanque de equalização e as duas lagoas são construídos em fibra de vidro e estão interligados entre si por meio de canalizações de PVC (50 mm), contando ainda com registros para controle de vazão e para permitir a manutenção dos mesmos. Os tanques de estocagem têm formato cilíndrico, são fechados e foram utilizados para armazenar o esgoto bruto. O tanque de*

equalização tem formato cilíndrico, é fechado, possui volume útil de 5000 L, funcionou com características anaeróbias. As duas lagoas possuem as mesmas dimensões de 4,20 x 2,40 x 1,00 m, ocupam área total de 10,08 m² e área útil de 8m², estão dispostas em série, nelas foi colocada a cobertura vegetal com lemna. A altura da coluna d'água foi de 42 cm em ambas as lagoas, totalizando um volume útil de aproximadamente 3500 L." Na Figura 13 pode-se observar o sistema piloto.

Figura 12. Esquema geral da etapa de hidrólise enzimática simultânea da fração amilácea e celulósica de lemna (*Landoltia punctata*) sem o uso de pré-tratamento.

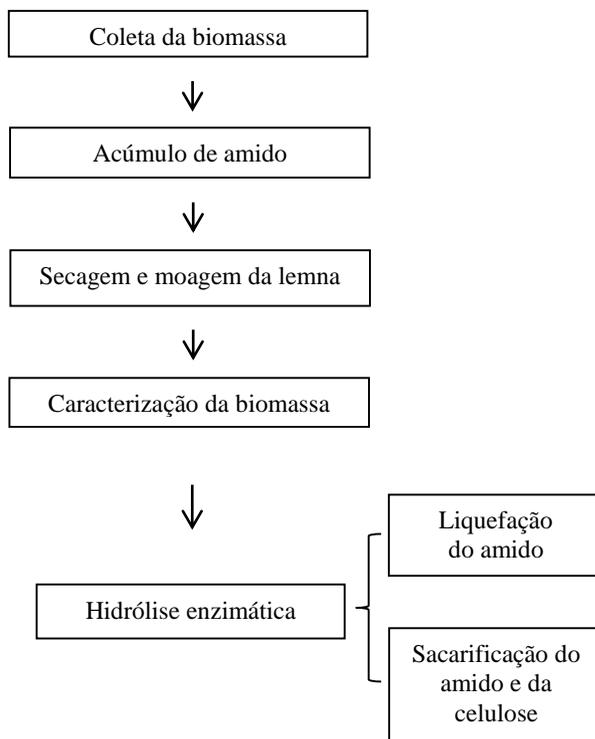


Figura 13. Imagem do sistema de tratamento com lagoas de lemnas em escala piloto, onde: 1) Tanque de equalização; 2) Lagoa de Lemnas 1; 3) Lagoa de Lemnas 2.



Fonte: Teles (2016).

A velocidade de crescimento atingida nesse sistema foi de $5,4 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ em massa seca. As lemnas foram coletadas da lagoa 1 durante os meses de julho a novembro de 2014, na cidade de Florianópolis, estado de Santa Catarina, no sul do Brasil, onde o clima é considerado subtropical úmido e a temperatura média anual é de $20,1 \text{ }^\circ\text{C}$ (INMET, 2014). As características da lagoa 1 podem ser visualizadas na Tabela 3.

Tabela 3. Características da lagoa de lemna para o tratamento de efluentes.

Parâmetros	Lagoa 1
pH	$7,0 \pm 0,6$
T ($^\circ\text{C}$)	19 ± 3
OD (mg L^{-1})	ND
Turbidez (UT)	19 ± 27
DQO (mg L^{-1})	74 ± 48
DBO (mg L^{-1})	19 ± 16
PT (mg L^{-1})	$7,0 \pm 4,9$
PO_4^{3-} (mg L^{-1})	$4,3 \pm 3,0$
NTK (mg L^{-1})	27 ± 18
NH_3^- (mg L^{-1})	21 ± 15
Alcalinidade (mg L^{-1})	171 ± 121
Coliformes totais (NMP 100 mL^{-1})	$3,13 \times 10^4$
<i>E. coli</i> (NMP 100 mL^{-1})	$1,00 \times 10^4$

OD: oxigênio dissolvido; UT: unidade de turbidez; DQO: demanda química de oxigênio; DBO: demanda biológica de oxigênio; PT: fósforo total; NTK: nitrogênio total de Kjeldahl; NMP: número mais provável; ND: não detectável.

Fonte: Brugnago (2014).

3.2.2 Enzimas

As enzimas utilizadas para hidrólise da lemna foram fornecidas pela empresa Novozymes, sendo elas:

- ✓ 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 $1,26 \text{ g mL}^{-1}$. 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 $1,15 \text{ g mL}^{-1}$. 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 $1,16 \text{ g mL}^{-1}$. A enzima possui pH ótimo de 3,0 a 4,2 e atividade de 10 a 60 °C (NOVOZYMES, 2012).
- ✓ Cellic CTec2: complexo celulolítico, 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).

A concentração das enzimas utilizadas nos experimentos foi expressa em % ($v\ m^{-1}$ em relação à massa seca de lemna). Ao longo do texto foi expressa apenas por “($v\ m^{-1}$)”.

3.2.3 Acúmulo de amido

Os experimentos referentes ao acúmulo de amido foram realizados nas dependências do LABEFLU e LARESO. Nesses experimentos, primeiramente foi avaliado o efeito da escassez de nutrientes por meio da transferência das lemnas do sistema de tratamento para solução de água destilada, sob condições fixas e controladas de temperatura e fotoperíodo. Posteriormente, avaliou-se o efeito da natureza da água (água destilada e água da rede de abastecimento). Por fim, avaliou-se a ampliação de escala sob condições ambientais naturais, ou seja, não controladas.

3.2.3.1 Efeito da escassez de nutrientes em água destilada sob condições ambientais controladas

As lemnas, originalmente coletadas das lagoas de tratamento, foram submetidas ao processo de lavagem em água corrente, a fim de retirar, ao máximo, possíveis nutrientes aderidos à planta. Em seguida, cerca de 0,5 g de lemna foram transferidos para potes de plásticos contendo 50 mL de água destilada. Os experimentos foram conduzidos em uma sala com fotoperíodo de 16/8 h dia/noite controlado por um *timer* analógico; intensidade de luz de $100\ \mu\text{mol}\ m^{-2}\ s^{-1}$ produzidas por lâmpadas de vapor de sódio, e temperatura ambiente de $25\ (\pm 2)\ ^\circ\text{C}$ controlada por ar condicionado, durante 10 dias (TAO et al., 2013) (Figura 14). O experimento foi realizado em três replicatas.

Realizou-se cinética destrutiva a fim de avaliar o tempo ideal para o acúmulo máximo de amido nas condições estudadas. Para isso, amostras foram coletadas a cada 24 horas, secas em estufa ($55\ ^\circ\text{C}/24\ \text{h}$), trituradas e peneiradas (0,5 mm) para análise do teor de amido (triplicata) pela metodologia do kit enzimático Megazyme (Anexo 1).

Figura 14. Coleta da biomassa de lemna e experimento do efeito da escassez de nutrientes sobre o acúmulo de amido em lemnas.



3.2.3.2 Efeito da natureza da água sob condições ambientais controladas

Frente aos resultados alcançados no experimento anterior que analisou o efeito da escassez de nutrientes no acúmulo de amido, foi realizado um novo experimento a fim de avaliar o efeito da natureza da água neste processo. O objetivo dessa etapa foi avaliar a necessidade do uso de água destilada no acúmulo de amido, levando em consideração o custo no processo em escala piloto. Para isso, as lemnas foram novamente coletadas das lagoas e submetidas ao processo de lavagem em água corrente. Em seguida, cerca de 0,5 g de lemna foram transferidos para potes de plásticos contendo 50 mL de água. Realizaram-se dois tratamentos, no tratamento 1 utilizou-se água destilada (AD) e no tratamento 2 utilizou-se água potável da rede de abastecimento (AR). A água utilizada no tratamento AR foi cedida pela Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN) durante o mês de novembro de 2014. A CASAN analisa a qualidade de sua água em relação aos parâmetros exigidos pela portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde, sendo eles, turbidez, cor aparente e cloro residual. Durante este período, a água apresentou-se em conformidade como pode ser observado no Anexo 2.

Os ensaios foram conduzidos nas mesmas condições citadas no item anterior, bem como a cinética. O experimento foi realizado em três replicatas e o teor de amido analisado em triplicata.

3.2.3.3 Ensaio em escala piloto sob condições ambientais não controladas

Para a ampliação de escala, o experimento foi realizado em caixas d'água de fibra de vidro de capacidade de 100 L. 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 continham

aproximadamente 30 L de água de rede de abastecimento. Realizou-se dois tratamentos, no tratamento 1 (T1) as caixas foram acondicionadas em sala com fotoperíodo de 16/8 h dia/noite controlado por um *timer* analógico; intensidade de luz de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas de vapor de sódio, e uma temperatura ambiente de $25 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ controlada por ar condicionado, durante 10 dias (TAO et al., 2013). No tratamento 2 (T2), as caixas foram expostas ao ar livre, sujeitas às condições climáticas, durante o mesmo período (Figura 15). O experimento foi realizado em três replicatas e o teor de amido analisado em triplicata.

Figura 15. Ensaio sob escassez de nutrientes em escala piloto para o acúmulo de amido em lemnas: a) condições ambientais controladas; b) condições ambientais não controladas.



Diariamente, amostras foram retiradas, secas em estufa ($55 ^\circ\text{C}/24$ h), trituradas, peneiradas ($0,5 \text{ mm}$) e analisadas quanto ao seu teor de amido pela metodologia do kit enzimático Megazyme.

3.2.4 Produção da biomassa enriquecida em amido e sua caracterização

A produção de biomassa enriquecida em amido foi realizada segundo o tratamento T2 explicado anteriormente. Esta etapa foi necessária para acumular biomassa suficiente para todo o estudo. Este experimento foi realizado durante todo o mês de novembro de 2014.

A biomassa enriquecida em amido foi seca ($55 ^\circ\text{C}$ por 24 horas), triturada e peneirada em peneiras de $600 \mu\text{m}$ para obtenção da biomassa seca e moída (BSM). Esta foi embalada em sacos plásticos, identificada e armazenada sob refrigeração ($7 \pm 2 ^\circ\text{C}$), até o momento das análises

(Figura 16). A BSM foi então caracterizada quanto ao teor de amido, celulose, cinzas, proteína bruta e umidade, conforme metodologia descrita no item 3.2.6.

Figura 16. Biomassa seca e moída de lemna enriquecida em amido.



3.2.5 Hidrólise enzimática

O processo da hidrólise enzimática foi dividido em duas partes, a liquefação do amido e a sacarificação do amido e da celulose. Nesse experimento estudou-se o efeito da concentração do substrato, do pH, da agitação, da temperatura e da concentração das enzimas no processo, bem como, a necessidade do uso de enzima complementar.

3.2.5.1 Liquefação do amido

Para o estudo da liquefação do amido, cinéticas destrutivas foram realizadas a fim de determinar as melhores condições de processo. A liquefação foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, com o volume útil de 50 mL de tampão acetato de sódio (50 mM), em banho-maria (Dubnoff NT 232, Nova Técnica) (Figura 17). Os valores das variáveis pH, concentração de lemna, concentração da enzima α -amilase Termamyl 2x, temperatura e agitação do processo foram baseados nas condições ótimas da enzima obtidas em ficha técnica e literatura consultada (NOVOZYMES, 2007; TORRES; LEONEL; MISCHAN, 2012).

Figura 17. Liquefação do amido de lemna em banho termostato com agitação.



Como resultado, analisou-se a concentração de glicose segundo método de glicose oxidase por meio de kit comercial (Glicose Liquiform, Labtest). Os resultados de glicose foram convertidos em eficiência da hidrólise (%) que foi utilizada como a variável resposta para as cinéticas. A eficiência do processo foi calculada sobre a quantidade de amido na matéria-prima utilizada no processo. O rendimento teórico da hidrólise ($Y_{teórico}$) do amido foi obtido pela Equação 4.

$$Y_{teórico}(\text{g L}^{-1}) = \frac{\left(\frac{180}{162}\right) * m_{amido}}{V} \quad (4)$$

Onde 180 é a massa molecular da glicose (g/mol); 162 é a massa molecular do monômero de glicose na molécula de amido (g/mol); m_{amido} é massa de amido (g); V é volume de meio (L). Considerando os valores de rendimento teórico foi calculada a eficiência da hidrólise pela Equação 5.

$$Eficiência (\%) = \frac{Y_{real}}{Y_{teórico}} * 100 \quad (5)$$

Onde Y_{real} é o rendimento de açúcares obtido no ensaio (g/L) e $Y_{teórico}$ é o rendimento que seria obtido da hidrólise total da massa de amido (g/L).

3.2.5.1.1 Estudo cinético: Efeito da concentração de lemna

Uma avaliação cinética foi realizada a fim de verificar a concentração de lemna que conduzisse à maior eficiência na hidrólise. Para isso, o ensaio foi conduzido à temperatura de 95 °C, agitação de 150 rpm, concentração de α -amilase de 10% (v m⁻¹), pH 5,0 e concentração de lemna variando em 4, 7 e 10% (m v⁻¹). Os frascos foram retirados para análise de glicose nos tempos 0, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos.

3.2.5.1.2 Estudo cinético: Efeito do pH

Em seguida, realizou-se um estudo cinético a fim de verificar o efeito do pH sobre a eficiência da hidrólise. O ensaio foi conduzido à temperatura de 95 °C, agitação de 150 rpm, concentração de α -amilase de 10% (v m⁻¹), concentração de substrato de 7% (m v⁻¹) e pH variando em 5,0; 6,0 e 7,0. Os frascos foram retirados para análise de glicose nos tempos 0, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos.

3.2.5.1.3 Estudo cinético: Efeito da agitação

Um estudo cinético foi também realizado para avaliar o efeito da agitação na conversão em glicose. A cinética destrutiva foi realizada a 95 °C, pH 6,0; concentração de substrato de 7% (m v⁻¹) e concentração de α -amilase em 10% (v m⁻¹), variando o tempo em 0, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos e a agitação em 50, 100 e 150 rpm.

3.2.5.1.4 Estudo cinético: Efeito da temperatura

A fim de verificar o efeito da temperatura na eficiência da hidrólise, cinéticas destrutivas foram conduzidas a 65, 80 e 95 °C. A agitação, pH, concentração de substrato e concentração de enzima foram fixados em 50 rpm, 6,0, 7% (m v⁻¹) e 10% (v m⁻¹), respectivamente. Os frascos foram retirados para análise de glicose nos tempos 0, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos.

3.2.5.1.5 Estudo cinético: Efeito da concentração de enzima α -amilase

Definidas as melhores condições do processo, realizou-se um estudo cinético destrutivo para verificar a concentração de enzima α -amilase que conduzisse à maior eficiência na hidrólise. A condição foi fixada em 65 °C, 50 rpm de agitação, pH 6,0, concentração de substrato

de 7% (m v^{-1}), variando o tempo em 0, 10, 20, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos e a concentração de α -amilase em 5; 10 e 20% (v m^{-1}).

3.2.5.2 *Sacarificação simultânea do amido e da celulose sem pré-tratamento*

A fim de determinar a contribuição de cada fração (amilácea e celulósica) na eficiência da hidrólise foram realizados estudos em separado. Primeiramente, as condições do processo foram otimizadas na fração amilácea, já que esta corresponde a maior proporção. Para isso, realizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional 2³ (DCCR) com intuito de avaliar o efeito do pH, temperatura e agitação na sacarificação do amido. Posteriormente, realizou-se estudos cinéticos para avaliar o uso de enzima complementar e a concentração de celulase na hidrólise da fração celulósica. Por fim, a sacarificação do amido e da celulose da lemna foi realizada simultaneamente, ou seja, utilizou-se tanto enzimas degradantes do amido como enzimas degradantes da celulose nas condições ótimas determinadas no DCCR.

3.2.5.2.1 Delineamento Composto Central Rotacional 2³

A sacarificação do amido de lemna foi realizada segundo um planejamento experimental estatístico, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com três variáveis independentes e seis repetições no ponto médio, totalizando 20 experimentos. As variáveis independentes foram pH, temperatura e agitação, e os valores dos seus níveis estão apresentados na Tabela 4. Esses valores foram baseados nas declarações do fabricante contidas nas fichas técnicas das enzimas e em dados da literatura (NOVOZYMES, 2012; CHEN et al., 2012).

Após a liquefação ser realizada nas condições otimizadas na etapa anterior, o pH da solução liquefeita foi ajustado para o valor definido em cada experimento, bem como a temperatura e a agitação do *shaker* (Excella E25, New Brunswick Scientific). Adicionou-se as enzimas amiloglucosidase (Spirizyme Fuel) e pectinase (Pectinex Ultra AFP) nas concentrações de 1 e 0,3% (v m^{-1}), respectivamente. Ao final de 8 horas, os frascos foram retirados do *shaker* e as amostras congeladas até o momento de análise.

Tabela 4. Variáveis e níveis estudados no DCCR 2³ para a otimização da sacarificação do amido de lemnas.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
pH	3,32	4	5	6	6,68
Temperatura (°C)	33,2	40	50	60	66,8
Agitação (rpm)	16	50	100	150	184

Como resposta analisou-se a concentração de glicose, segundo método de glicose oxidase por meio de kit comercial (Glicose Liquiform, Labtest). Os teores de glicose foram convertidos em eficiência da hidrólise (%) que foi utilizada como a variável resposta para o planejamento. Os resultados foram analisados usando o software Statistica® 7.0 Statsoft Inc. e, por meio da análise de superfície de resposta, determinaram-se os valores ótimos dessas variáveis para maior eficiência do processo.

3.2.5.2.2 Estudo cinético: Efeito da concentração das celulasas

A cinética destrutiva foi realizada a pH 5,0 (corrigido com a adição de ácido acético PA); temperatura 45 °C; agitação 100 rpm; variando a concentração de celulase Ctec (5; 10 e 20% v m⁻¹) e celulase Htec (0; 1 e 2% v m⁻¹). O nível inferior da concentração de celulase Htec foi realizado a fim de avaliar a sua real necessidade como enzima complementar na hidrólise da celulose de lemna.

Experimentos destrutivos foram realizados, sendo as reações conduzidas nos tempos de 0, 30 minutos e 1, 2, 4, 6 horas de reação. Como resultado, analisou-se a concentração de glicose, segundo método de glicose oxidase por meio de kit comercial (Glicose Liquiform, Labtest). Os teores de glicose foram convertidos em eficiência da hidrólise (%) que foi utilizada como a variável resposta para a cinética.

3.2.6 Metodologia descritiva

3.2.6.1 Análises físico-químicas

3.2.6.1.1 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 em anexo a este documento. O método é baseado na conversão de amido em glicose pela combinação das enzimas α -amilase e amiloglucosidase seguida pela quantificação de glicose usando técnica colorimétrica (oxidase/peroxidase).

3.2.6.1.2 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 massa após mufla a 500 °C.

3.2.6.1.3 Cinzas

Determinação do resíduo inorgânico por meio da incineração (mufla a 540 °C) da matéria orgânica, a qual é reduzida a CO₂, onde o material restante é composto por minerais na forma de cinzas (AOAC, 2012).

3.2.6.1.4 Glicose

A concentração de glicose foi determinada segundo o método de glicose oxidase por meio de kit (Glicose Liquiform, Labtest), conforme descrição no item 3.2.6.2.2.

3.2.6.1.5 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).

3.2.6.1.6 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.

3.2.6.1.7 Umidade

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

3.2.6.2 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada nas condições padronizadas pelas metodologias utilizadas (pH e temperatura), bem como nas condições do processo do presente estudo, a fim de analisar o efeito das condições do processo na atividade das enzimas.

3.2.6.2.1 Enzima α -amilase (Termamyl 2X)

A atividade enzimática da α -amilase foi determinada segundo Moraes; Astol Filho e Ulhoa (1999) com adaptações. As determinações foram realizadas em triplicata, sendo divididas em três etapas: preparo das soluções (amido e enzima); reação das soluções e leitura da absorbância.

A solução de amido foi preparada utilizando amido solúvel P. A. (Synth) na concentração de 0,7% $m\ v^{-1}$ e, em sequência, foi aquecida em microondas por cinco minutos para que o amido fosse gelatinizado. A solução de enzima foi preparada a 10% $v\ v^{-1}$ de enzima α -amilase e em sequência aquecida a 60 °C por 5 minutos.

As reações das soluções de enzima, do amido e do branco, foram realizadas em tubos de ensaio, utilizando tampão acetato de sódio 0,05 M em pH 6,0, conforme a Tabela 5.

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).

Tabela 5. Alíquotas da solução de reação da amostra, amido e branco para atividade enzimática da 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

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 $U\ mL^{-1}$ com base na Equação 6.

$$U\ mL^{-1} = \frac{\left(\frac{(Abs_{CS} + Abs_{CE}) - Abs_A}{(Abs_{CS} + Abs_{CE})} \right) \times Q_s \times f}{t \times Q_E} \quad (6)$$

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.

3.2.6.2.2 Enzima amiloglicosidase (Spirizyme Fuel)

A atividade enzimática da amiloglicosidase foi determinada segundo Moraes; Astol Filho e Ulhoa (1999). As determinações foram realizadas em triplicata, sendo subdivididas em três etapas: preparo de soluções (amido e amostra); reação e determinação da concentração de glicose.

A solução de amido foi preparada utilizando amido solúvel na concentração de 0,5% m v⁻¹ em tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 4,5). Para que ocorresse a gelatinização, a solução foi aquecida em micro-ondas por 5 minutos. A solução de enzima foi preparada na concentração de 0,01% v v⁻¹ da enzima amiloglicosidase.

As reações da amostra e do branco foram realizadas em tubos de ensaio segundo descrito na Tabela 6.

Tabela 6. Alíquotas da solução de reação da amostra e branco para análise da atividade enzimática da amiloglicosidase.

	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 interrompida 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). O experimento com o kit glicose oxidase foi realizado conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7. 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 MI
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 (Espectrofotômetro Bel Photonics, SP 1105).

Uma unidade de atividade de amiloglucosidase (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⁻¹, com base nas Equações 7 e 8:

$$\text{Glicose (mg dL}^{-1}\text{)} = (\text{Abs amostra}/\text{Abs padrão}) \times 100 \quad (7)$$

$$\text{U mL}^{-1} = [\text{Glicose}/(0,18 \times t)] \times f \times 100 \quad (8)$$

Sendo:

Abs Amostra = absorbância lida na amostra;

Abs Padrão = absorbância lida no padrão de glicose;

0,18 = massa molar da glicose (mg µmol⁻¹);

t = tempo de reação da amostra (min);

f = fator de diluição;

100 = conversão de dL para mL.

3.2.6.2.3 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 DNS (ácido 3-amino-5-nitrossalicílico) de Miller (1959).

A determinação da atividade 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 é apresentado na Tabela 8.

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. A seguir, 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 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. 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⁻¹).

Tabela 8. 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 (unidade)	1	-	-	1
Tampão (mL)	1,0	1,5	1,0	1,5

Segundo Ghose (1987), uma unidade de atividade enzimática (U) libera 1 μmol de açúcar redutor por minuto. A partir da Equação 9 calculou-se a atividade enzimática.

$$U \text{ mL}^{-1} = ART \times \frac{V_T}{0,18 \times V_E \times t} \quad (9)$$

Sendo que:

ART = açúcares redutores totais produzidos na etapa de hidrólise (mg mL⁻¹);

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

0,18 = massa molar de glicose (mg μmol⁻¹);

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

t = tempo de hidrólise (minutos).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

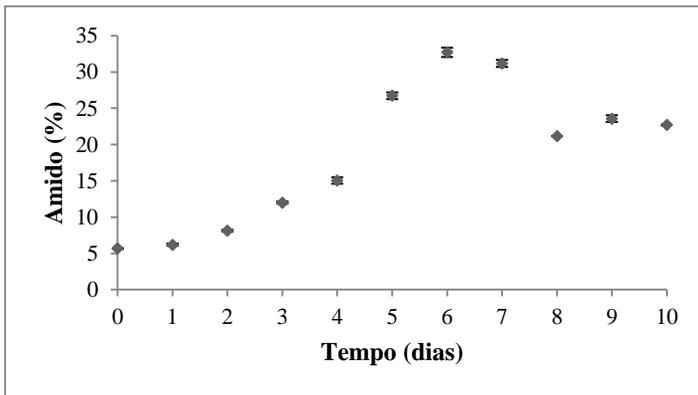
3.3.1 Acúmulo de amido

Segundo metodologia descrita no item 3.2.3, foram realizados experimentos para avaliar o efeito da escassez de nutrientes e da natureza da água no acúmulo de amido na lemna, bem como amplificar a escala em condições climáticas não controladas.

3.3.1.1 Efeito da escassez de nutrientes em água destilada sob condições ambientais controladas

O primeiro experimento foi realizado para avaliar o efeito da escassez de nutrientes no acúmulo de amido em lemnas. Para isso, as lemnas foram acondicionadas em potes com água destilada, fotoperíodo de 16/8 h dia/noite, intensidade de luz de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura ambiente de $25 (\pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados do estudo cinético realizado ao longo de 10 dias podem ser observados na Figura 18.

Figura 18. Efeito da escassez de nutrientes no acúmulo de amido em lemnas. Água destilada, FP 16/8h, IL $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$.



FP: fotoperíodo

IL: intensidade luminosa

*As barras representam o desvio padrão entre as médias.

No tempo inicial, a lemna apresentou $5,7\%$ (m m^{-1}) de amido, atingindo o seu teor máximo de $32,7\%$ (m m^{-1}) no sexto dia. Portanto, em

seis dias de tratamento obteve-se um aumento de 480% no teor de amido da lemna. Depois do sexto dia houve um decréscimo, sendo que ao final do décimo dia a lemna apresentou 22,7% de amido.

Os resultados obtidos indicam que sob condições de escassez de nutrientes a lemna acumula amido até certo ponto e depois começa a consumi-lo. Portanto, o tempo ótimo para o acúmulo máximo de amido nas condições estudadas foi de seis dias.

Sabe-se que 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 o estresse. Na escassez de nutrientes ocorre deficiência de nitrogênio que retarda o crescimento vegetativo da lemna, o que consequentemente pode provocar o acúmulo de amido (XU et al., 2011). Segundo Tao et al. (2013), o que ocorre quimicamente na lemna submetida à supressão dos nutrientes essenciais, é o redirecionamento do fluxo metabólico para fixação de dióxido de carbono na forma de amido, resultando em seu acúmulo.

Tao et al. (2013) também estudaram o acúmulo de amido em *Landoltia punctata* com água destilada. A biomassa continha inicialmente 3,0% (m m^{-1}) de amido e em 24 h de escassez de nutriente a quantidade foi para 18,3% (m m^{-1}) chegando a 45,8% (m m^{-1}) em 7 dias sob fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro). A maior quantidade de amido encontrada, em relação ao estudo presente, pode ser atribuída à maior intensidade de luz ($130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 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.

Embora as menores temperaturas possam afetar negativamente a produção de biomassa, ela favorece o acúmulo de amido por reduzir a respiração das plantas durante o período noturno, quando o consumo de amido é substancial (XU et al., 2011). Como a energia necessária para o armazenamento de amido é adquirida a partir da fotossíntese, de acordo com Xiao et al. (2013) o acúmulo de amido concorre com o crescimento celular. 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.

3.3.1.2 Efeito da natureza da água sob condições ambientais controladas

Com o propósito de avaliar a necessidade do uso de água destilada no acúmulo de amido, realizou-se dois tratamentos nas mesmas condições citadas anteriormente no experimento “efeito da escassez de nutrientes sob condições controladas”. No tratamento 1 utilizou-se água destilada (AD) e no tratamento 2 utilizou-se água de rede de abastecimento (AR). Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9. Teores de amido (%) nos tratamentos AD e AR. FP 16/8h, IL 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura 25 °C.

		Amido (%)										
		T 0	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8	T 9	T 10
AR		5,7	6,7	6,9	16,9	17,8	28,4	24,1	21,3	20,2	20,4	21,1
		$\pm 0,2^a$	$\pm 0,3^a$	$\pm 0,1^b$	$\pm 0,3^a$	$\pm 0,2^a$	$\pm 0,6^a$	$\pm 0,4^b$	$\pm 0,3^b$	$\pm 0,5^b$	$\pm 0,3^b$	$\pm 0,1^b$
AD		5,7	6,2	8,1	12,0	15,0	26,7	32,7	31,2	21,3	23,6	22,7
		$\pm 0,2^a$	$\pm 0,1^a$	$\pm 0,1^a$	$\pm 0,2^b$	$\pm 0,4^b$	$\pm 0,4^b$	$\pm 0,6^a$	$\pm 0,5^a$	$\pm 0,1^a$	$\pm 0,5^a$	$\pm 0,1^a$

AD: água destilada

AR: água da rede de abastecimento

FP: fotoperíodo

IL: intensidade luminosa

T0; T1; T2; T3; T4; T5; T6; T7; T8; T9 e T10: tempos de 0 a 10 dias.

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

Conforme apresentado na Tabela 9, o tratamento com água de rede de abastecimento (AR) apresentou maior teor de amido, 28,4%, no quinto dia de experimento. Depois houve um decréscimo, e ao final dos 10 dias apresentou 21,1% de amido. Considerando o teor inicial (T0), 5,7% de amido, em apenas 5 dias houve um aumento de 4,0 vezes no teor de amido para o tratamento AR. No tratamento com água destilada (AD) houve um aumento de 4,8 vezes no teor de amido com 6 dias de experimento.

Os teores de amido entre os tratamentos AR e AD diferenciaram-se entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). O tratamento AD apresentou teores maiores que o AR em quase todo o tempo. com diferença de 13% entre os maiores teores de cada tratamento (AD-32,7%; AR-28,4%). Esta diferença, quando analisada a viabilidade econômica, pode ser considerada pequena, pois para a produção de 1 L de água destilada são utilizados 20 L de água de rede de abastecimento. Como em ambos os tratamentos houve um aumento considerável no teor de amido, provavelmente a água destilada não foi o fator isolado determinante para o acúmulo deste. Desta forma, o uso da água da rede de abastecimento em grande escala se justifica pela sua maior viabilidade, além de ter

alcançado seu teor de amido máximo em um menor tempo de processo quando comparado ao outro tratamento.

3.3.2.3 Ensaio em escala piloto sob condições ambientais não controladas

Nesta etapa avaliou-se a ampliação de escala sob condições ambientais controladas e não controladas. Para isso, dois tratamentos foram realizados, sendo o tratamento 1 (T1) com as condições ambientais controladas (fotoperíodo de 16/8 h dia/noite, intensidade de luz de 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e temperatura ambiente de 25 (± 2) $^{\circ}\text{C}$), e o tratamento 2 (T2) em que as caixas foram acondicionadas ao ar livre, sujeitas às condições ambientais. Os resultados referentes a estes experimentos podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10. Teores de amido em lemnas sob condições ambientais controladas (T1: FP 16/8h, IL 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e temperatura 25 $^{\circ}\text{C}$) e sob variações climáticas (T2).

Ensaio	Amido (%)						
	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5	Tempo 6	Tempo 7
	20,0	19,5	20,5	24,4	28,5	31,3	31,1
T1	$\pm 0,4$ ^a	$\pm 0,04$ ^b	$\pm 0,4$ ^b	$\pm 0,02$ ^a	$\pm 0,2$ ^a	$\pm 0,5$ ^a	$\pm 0,6$ ^a
	20,4	22,6	26,7	23,7	21,7	21,0	18,7
T2	$\pm 1,5$ ^a	$\pm 0,7$ ^a	$\pm 0,6$ ^a	$\pm 0,1$ ^b	$\pm 0,8$ ^b	$\pm 0,5$ ^b	$\pm 0,6$ ^b

FP: fotoperíodo

IL: intensidade luminosa

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

Conforme apresentado na Tabela 10, o tratamento T1 apresentou seu maior teor de amido (31,3%) no sexto dia do experimento. Já o tratamento T2 apresentou 26,7% de amido como seu teor máximo no terceiro dia de experimento e logo após houve um decréscimo, e ao final do sétimo dia apresentou 18,7% de amido. O experimento foi realizado em novembro de 2014, com temperaturas máximas de 25 $^{\circ}\text{C}$ e mínimas de 14 $^{\circ}\text{C}$, temperaturas amenas que favorecem o acúmulo de amido.

Os teores de amido entre os tratamentos T1 e T2 diferenciaram-se entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) na maioria dos tempos analisados. Apesar do tratamento T1 ter apresentado o maior teor de amido (31,3%), a diferença entre este e o maior teor de amido do T2 (26,7%) foi de apenas 14,7%. Essa diferença pode ser considerada pequena se for levado em consideração o custo necessário para controlar a temperatura, a

intensidade luminosa e o fotoperíodo. Além disso, o T2 atingiu um teor de amido 14,75% menor que o T1, porém em um tempo 50% menor que este. O que confere ao T2 uma produtividade maior, sendo ela de 8,9% ao dia, enquanto que o T1 apresentou uma produtividade de 5,2% ao dia.

Os resultados alcançados nesta etapa sugerem que é possível acumular amido em lemnas cultivadas em água da rede de abastecimento sob condições ambientais naturais, ou seja, sem controle da temperatura e do fotoperíodo. Porém, sabe-se que em temperaturas amenas à frias o acúmulo de amido é favorecido. Desta forma, é interessante levar em consideração a época do ano e as particularidades climáticas de cada local, a fim de garantir que as condições ambientais favoreçam o acúmulo de amido nas lemnáceas.

3.3.2 Caracterização físico-química da matéria-prima

Os resultados das análises de caracterização da biomassa de lemnas enriquecida em amido estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Composição da biomassa de lemnas em base seca.

Componente	% (m m ⁻¹)
Umidade	7,22 ± 0,77
Amido	25,83 ± 0,44
Celulose	12,85 ± 0,07
Proteína Bruta	35,28 ± 0,15
Cinzas	10,56 ± 0,18

A avaliação do teor de umidade da biomassa de lemnas tem grande importância, em razão da influência deste na conservação de suas propriedades, tendo em vista que níveis maiores que 13% podem proporcionar crescimento microbiano e deterioração em curto tempo. O valor de umidade obtido (7,22%) encontra-se abaixo desse limite, mostrando ser favorável a uma maior estabilidade do material.

O teor de amido encontrado foi de 25,83%, quantidade similar aos 24,59% encontrados por Chen et al. (2012) 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 amido 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 (XIAO et al., 2013).

A celulose apresentou valor médio de 12,85%, valor próximo aos 13,31% encontrado por Chen et al. (2012) também em *L. punctata* e em conformidade com Ge et al. (2012), que afirmam que lemnáceas apresentam conteúdo relativamente baixo de celulose (aproximadamente 10% em massa seca) em comparação com plantas terrestres (aproximadamente 50% em massa seca) e, que em seu estudo com *Lemna minor* encontrou 9,4%.

À semelhança de outros componentes da biomassa, o teor de celulose depende da espécie, sendo responsável por dar a rigidez e firmeza às plantas. 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 35,28%. 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%. Chen et al. (2012) obtiveram 16,27% em condições naturais de crescimento e Tao et al. (2013) encontraram um valor 29,6% em solução nutritiva padrão.

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

O teor de cinzas determina o conteúdo de elementos minerais presente na amostra. Foi encontrado um teor de 10,56% (m m^{-1} base seca), valor superior ao encontrado por Chen et al. (2012) que foi de 3,48% e inferior aos 17,7% encontrado por Ge et al. (2012) em *Lemna minor*. 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.

3.3.3 Hidrólise enzimática

3.3.3.1 Liquefação do amido

3.3.3.1.1 Estudo cinético: Efeito da concentração de lemna

Para a avaliação da liquefação do amido, primeiramente foi realizado um estudo cinético a fim de verificar a melhor concentração de lemna a ser utilizada. Os valores de temperatura, pH, agitação e concentração de α -amilase foram fixados em 95 °C; 5,0; 150 rpm e 10% ($v\ m^{-1}$), respectivamente. O tempo variou em 0, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos. Os resultados obtidos em termos de eficiência são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Efeito da concentração de lemna (4%, 7% e 10%, $m\ v^{-1}$) na eficiência da liquefação do amido de lemna.

Concentração lemna % ($m\ v^{-1}$)	Eficiência (%)				
	10 min	20 min	30 min	60 min	120 min
4	19,1±1,1 ^a	25,8±1,6 ^a	29,9±2,1 ^a	31,3±1,9 ^{a,b}	37,0±1,8 ^{a,b}
7	16,5±0,2 ^a	17,2±0,2 ^b	25,2±0,5 ^a	36,8±1,0 ^a	41,4±4,0 ^a
10	16,6±0,9 ^a	19,2±0,3 ^b	25,0±1,1 ^a	26,6±1,2 ^b	28,6±3,1 ^b

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

De acordo com a Tabela 12 observa-se que após 2 horas de reação, os ensaios com concentrações de lemna de 4, 7 e 10% ($m\ v^{-1}$) obtiveram uma eficiência na hidrólise de 37,0; 41,4 e 28,6%, respectivamente.

Para uma enzima típica, à medida que a concentração de substrato aumenta a velocidade inicial se eleva até alcançar um valor máximo. Quando aumentos adicionais na concentração do substrato já não mais elevam a velocidade inicial diz-se que a enzima está saturada pelo substrato (MURRAY et al., 2007). Possivelmente foi o que aconteceu na concentração de 10% ($m\ v^{-1}$) de lemna que apresentou a menor eficiência no tempo final de 2 horas. Os ensaios referentes às concentrações de 4 e 7% ($m\ v^{-1}$), ao final do processo, não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) segundo o teste de Tukey. Portanto, optou-se pelo ensaio com concentração de 7% ($m\ v^{-1}$) de lemna para as próximas etapas.

3.3.3.1.2 Estudo cinético: Efeito do pH

A cinética de liquefação do amido de lemna com diferentes valores de pH (5,0; 6,0 e 7,0) está apresentada na Tabela 13. Os valores de temperatura, agitação, concentração de α -amilase e de lemna foram fixados em 95 °C; 150 rpm; 10% (v m⁻¹) e 7% (m v⁻¹), respectivamente. O tempo variou em 0, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos.

Tabela 13. Efeito do pH na eficiência da liquefação do amido de lemna.

pH	Eficiência (%)				
	10 min	20 min	30 min	60 min	120 min
5	16,5±0,2 ^c	17,2±0,2 ^c	25,2±0,4 ^b	36,4±0,7 ^b	41,4±3,0 ^b
6	22,8±0,2 ^a	28,2±0,8 ^a	35,1±2,0 ^a	38,3±0,8 ^a	50,5±2,2 ^a
7	17,9±0,3 ^b	24,0±0,2 ^b	26,6±1,0 ^b	39,3±0,5 ^a	51,4±1,7 ^a

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

Os ensaios com pH de 5,0; 6,0 e 7,0 apresentaram, após 2 horas de reação, uma eficiência na hidrólise de 41,4; 50,5 e 51,4%, respectivamente. Nota-se que, após 2 horas de reação, as eficiências dos ensaios com pH 6 e 7 não apresentaram diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$) segundo o teste de Tukey. O ensaio com pH 5 obteve a menor eficiência, isso porque as enzimas possuem uma faixa de pH na qual a sua atividade é máxima e em valores fora dessa faixa, sua atividade diminui (LEHNINGER, 2006).

O ensaio com pH 6,0 foi definido para as próximas etapas, já que seu valor se aproxima mais do pH ótimo da sacarificação (pH 5), necessitando dessa forma de uma quantidade menor de ácido para o ajuste do pH.

3.3.3.1.3 Estudo cinético: Efeito da agitação

A cinética de liquefação do amido de lemna com diferentes velocidades de agitação (50, 100 e 150 rpm) está apresentada na Tabela 14. Os valores de temperatura, pH, concentração de α -amilase e de lemna foram fixados em 95 °C; 6,0; 10% (v m⁻¹ em relação a massa de lemna) e 7% (m v⁻¹), respectivamente. O tempo variou em 0, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos.

Tabela 14. Efeito da agitação na eficiência da liquefação do amido de lemna.

Agitação (rpm)	Eficiência (%)				
	10 min	20 min	30 min	60 min	120 min
50	22,5±0,2 ^a	28,0±1,2 ^a	34,9±2,9 ^a	38,1±1,2 ^b	50,3±3,1 ^a
100	22,2±0,7 ^a	28,2±2,1 ^a	31,3±0,7 ^a	40,9±0,7 ^{a,b}	48,3±0,3 ^a
150	21,6±0,5 ^a	27,6±0,1 ^a	33,2±0,4 ^a	44,7±0,8 ^a	55,2±0,4 ^a

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

Os ensaios com agitação de 50, 100 e 150 rpm apresentaram, após 2 horas de reação, uma eficiência na hidrólise de 50,3; 48,3 e 55,2%, respectivamente. Após duas horas de reação, as eficiências dos diferentes tratamentos não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) segundo o teste de Tukey. Portanto, a agitação de 50 rpm é suficiente para o processo, não sendo necessário o uso de maiores velocidades. Esse resultado se torna interessante no que se diz respeito à economia energética no processo.

3.3.3.1.4 Estudo cinético: Efeito da temperatura

Diante do resultado alcançado na cinética que avaliou o efeito da agitação na cinética enzimática, pensando ainda em economia do processo, fez-se um estudo cinético para avaliar o efeito da temperatura na liquefação do amido de lemna. Para isso, a cinética foi realizada com diferentes valores de temperatura (65, 80 e 95 °C) e os valores de agitação, pH, concentração de α -amilase e de lemna foram fixados em 50 rpm; 6,0; 10% ($v\ m^{-1}$ em relação a massa de lemna) e 7% ($m\ v^{-1}$), respectivamente. O tempo variou em 0, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos. Os resultados obtidos em termos de eficiência estão apresentados na Tabela 15.

Os ensaios com temperatura de 65, 80 e 95 °C apresentaram, após 2 horas de reação, uma eficiência na hidrólise de 50,6; 49,2 e 53,4%, respectivamente.

As eficiências dos diferentes tratamentos não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) segundo o teste de Tukey. Esse resultado representa uma grande vantagem competitiva da lemna, pois confere uma economia no processo, já que a menor temperatura (65 °C) pode atingir a mesma eficiência da maior temperatura (95 °C).

Tabela 15. Efeito da temperatura na eficiência da liquefação do amido de lemna.

Temperatura (°C)	Eficiência (%)				
	10 min	20 min	30 min	60 min	120 min
65	17,8±1,7 ^a	23,9±1,2 ^a	29,6±0,7 ^a	38,8±2,1 ^a	50,6±2,6 ^a
80	17,2±0,7 ^a	26,1±1,6 ^a	34,3±2,6 ^a	40,8±1,2 ^a	49,2±1,9 ^a
95	18,2±0,5 ^a	28,6±1,0 ^a	37,0±3,2 ^a	42,7±2,4 ^a	53,4±1,5 ^a

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

A temperatura de liquefação varia de acordo com a fonte de amido. Quando uma suspensão aquosa de amido é aquecida, as ligações enfraquecidas permitem que os grânulos possam absorver água. Ao mesmo tempo em que ocorre a quebra das ligações de hidrogênio, ocorre o intumescimento do grânulo que libera cadeias de amilose e amilopectina. Dessa forma, a solubilidade do amido tende a aumentar, com aumento paralelo da viscosidade e transparência das suspensões iniciais. Assim, tem-se o processo de gelatinização. Nessas condições, as enzimas α -amilases aumentam a velocidade de hidrólise, em sistema de ataque múltiplo, cuja formação de complexo entre enzima e substrato, dará origem às primeiras clivagens. Parte da cadeia será liberada e a parte remanescente continuará complexada com a enzima quando várias ligações α -1,4 serão hidrolisadas até a dissociação do sítio da enzima (CABELLO, 1995). Apesar de não ter sido realizada análise referente à gelatinização do amido de lemna, os resultados sugerem que a temperatura de gelatinização desse é relativamente baixa frente a outras fontes de amido. Os hidrolisados produzidos a partir de mandioca, por exemplo, apresentam essa mesma vantagem competitiva, pois podem ser elaborados através de um processo mais simples e com menor investimento, devido, dentre outras características, à menor temperatura de gelatinização quando comparadas ao milho (SURMELY et al., 2003).

3.3.3.1.5 Estudo cinético: Efeito da concentração de enzima α -amilase

Após os melhores valores de concentração de lemna ($7\% \text{ m v}^{-1}$), pH (6,0), agitação (50 rpm) e temperatura ($65\text{ }^\circ\text{C}$) terem sido definidos, realizou-se um estudo cinético para verificar a melhor concentração de enzima a ser utilizada. O tempo variou em 0, 10, 20, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos.

De acordo com a Tabela 16 observa-se que após 3 horas de reação, nas concentrações de enzima de 5, 10 e 20% ($v\ m^{-1}$), obteve-se uma eficiência na hidrólise de 48,4; 60,5 e 72,6%, respectivamente.

Tabela 16. Efeito da concentração de enzima na eficiência da liquefação do amido de lemna.

Concentração de enzima % ($v\ m^{-1}$)	Eficiência (%)						
	10 min	20 min	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min
	10,0	13,0	20,2	27,4	37,4	44,4	48,4
5	$\pm 0,7^c$	$\pm 0,6^c$	$\pm 0,1^c$	$\pm 1,1^c$	$\pm 0,4^c$	$\pm 3,5^c$	$\pm 2,1^c$
	22,6	28,0	34,9	38,1	50,3	58,4	60,4
10	$\pm 0,2^b$	$\pm 1,2^b$	$\pm 2,9^b$	$\pm 1,2^b$	$\pm 3,1^b$	$\pm 2,8^b$	$\pm 0,1^b$
	29,8	36,3	43,9	52,3	70,8	72,5	72,6
20	$\pm 2,8^a$	$\pm 2,4^a$	$\pm 0,7^a$	$\pm 0,7^a$	$\pm 1,3^a$	$\pm 0,5^a$	$\pm 2,6^a$

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

As eficiências dos diferentes tratamentos apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) segundo o teste de Tukey, sugerindo que a concentração de enzima teve efeito na liquefação do amido de lemna. Os maiores valores de concentração de enzima obtiveram as maiores eficiências. Nota-se que ao dobrar a concentração de enzima de 5 para 10%, a eficiência aumentou 25%, já ao dobrar a concentração de 10 para 20%, esse aumento foi de 20%. Sendo assim, as condições escolhidas para a liquefação do amido de lemna foram 7% ($m\ v^{-1}$) de concentração de lemna, agitação de 50 rpm, pH 6,0, temperatura de 65 °C, concentração de α -amilase de 10% ($v\ m^{-1}$) e tempo de 3 horas.

3.3.4 Sacarificação simultânea do amido e da celulose de lemna sem pré-tratamento

3.3.4.1 Sacarificação do amido: DCCR 2³

A otimização da sacarificação do amido foi realizada segundo um Delineamento Composto Central Rotacional 2³, totalizando 20 experimentos, para verificar a influência das variáveis pH, temperatura e agitação na eficiência da hidrólise. A concentração de lemna já estabelecida na liquefação foi mantida constante (7% $m\ v^{-1}$), as concentrações das enzimas amiloglicosidase (1% $v\ m^{-1}$) e pectinase (0,3% $v\ m^{-1}$) também foram mantidas constantes e o tempo fixo em 8 horas. Na Tabela 17 apresenta-se a matriz do planejamento e resultados

referentes aos experimentos DCCR 2³ para a sacarificação do amido de lemna.

Tabela 17. Matriz do delineamento composto central rotacional 2³ (DCCR) e a eficiência da sacarificação do amido de lemna.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Eficiência da hidrólise (%)
1	-1 (4)	-1 (40)	-1 (50)	73,7
2	1 (6)	-1 (40)	-1 (50)	66,3
3	-1 (4)	1 (60)	-1 (50)	72,6
4	1 (6)	1 (60)	-1 (50)	77,9
5	-1 (4)	-1 (40)	1 (150)	88,9
6	1 (6)	-1 (40)	1 (150)	59,3
7	-1 (4)	1 (60)	1 (150)	74,8
8	1 (6)	1 (60)	1 (150)	59,1
9	-1,68 (3,32)	0 (50)	0 (100)	70,0
10	1,68 (6,68)	0 (50)	0 (100)	58,6
11	0 (5)	-1,68 (33,2)	0 (100)	77,3
12	0 (5)	1,68 (66,8)	0 (100)	84,1
13	0 (5)	0 (50)	-1,68 (16)	94,0
14	0 (5)	0 (50)	1,68 (184)	73,8
15	0 (5)	0 (50)	0 (100)	103,0
16	0 (5)	0 (50)	0 (100)	102,2
17	0 (5)	0 (50)	0 (100)	104,5
18	0 (5)	0 (50)	0 (100)	92,5
19	0 (5)	0 (50)	0 (100)	89,5
20	0 (5)	0 (50)	0 (100)	102,2

De acordo com a Tabela 17, pode-se observar que a eficiência da sacarificação do amido de lemna apresentou uma variação de 58,6 a 99,0% (média do ponto central). Em condições intermediárias da hidrólise ocorreu a maior eficiência, indicando um ponto de máximo no ponto central do experimento, ou seja, com pH de 5,0; temperatura de 50 °C e agitação de 100 rpm.

Os resultados apresentados na Tabela 17 referentes à eficiência da hidrólise foram tratados estatisticamente para a avaliação dos efeitos de cada variável independente sobre a resposta (Tabela 18).

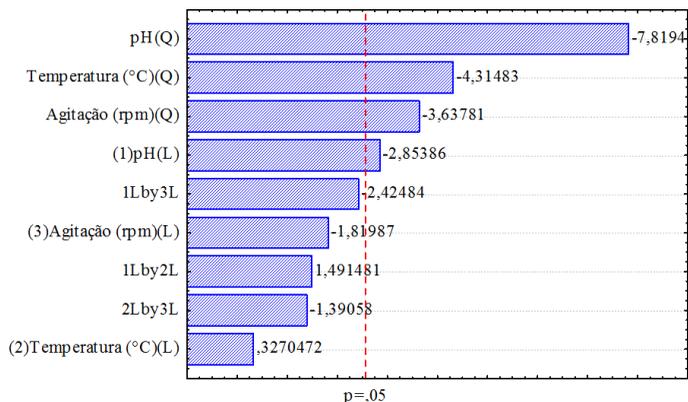
Tabela 18. Análise dos efeitos das variáveis sobre a eficiência da sacarificação do amido de lenna.

	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t (5)	p – valor
Média	99,10	2,57	38,57	0,00
pH (L)	-4,87	1,71	-2,85	0,04
pH (Q)	-13,00	1,66	-7,81	0,00
Temperatura (L)	0,56	1,71	0,33	0,76
Temperatura (Q)	-7,17	1,66	-4,31	0,01
Agitação (L)	-3,10	1,71	-1,82	0,13
Agitação (Q)	-6,05	1,66	-3,64	0,01
pH (L) x Temperatura (L)	3,32	2,23	1,49	0,20
pH (L) x Agitação (L)	-5,40	2,23	-2,42	0,06
Temperatura (L) x Agitação (L)	-3,10	2,23	-1,39	0,22

Os efeitos principais e de interação das variáveis independentes foram considerados com um limite de confiança de 95%, portanto para que os efeitos calculados sejam estatisticamente significativos, o valor de “p” correspondente deve ser menor que 0,05. Nota-se na Tabela 18, em negrito, os efeitos que foram significativos.

O diagrama de Pareto é uma das formas de se avaliar visualmente a influência dos fatores estudados na resposta. A magnitude dos efeitos é representada pelas colunas enquanto que a linha transversal às colunas representa a magnitude dos efeitos com significado estatístico para $p=0,05$, ou seja, os fatores que são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (Figura 19). Observando a Figura 19 é possível afirmar que o efeito quadrático do pH foi o que mais influenciou a eficiência da sacarificação, seguido do efeito quadrático da temperatura, da agitação, e do efeito linear do pH. Os outros efeitos não foram significativos ao nível de 95% de confiança (Figura 19) significância.

Figura 19. Diagrama de Pareto para a eficiência da sacarificação do amido de lema.



A influência do pH (Q) indica que existe um aumento da eficiência com o aumento do pH até certo ponto e depois a produção diminui, ou seja, há um pH no qual a atividade enzimática é máxima ou ótima para aquelas condições. A ação catalítica de uma reação enzimática é alcançada dentro de limites muito estreitos de pH. Cada reação tem um pH ótimo que, para a maioria das enzimas se situa entre 4,5 e 8,0 e no qual a enzima apresenta a sua atividade máxima (BOBBIO; BOBBIO,1995).

O mesmo ocorreu com a temperatura (Q), ou seja, há aumento da eficiência com o aumento da temperatura até níveis considerados ótimos da enzima e a partir deste ponto, há decréscimo na eficiência devido à desnaturação das enzimas.

A temperatura exerce uma grande influência na atividade e estabilidades das enzimas. Um aumento dessa causa maior energia cinética as moléculas dos reagentes ocasionando maior número de colisões produtivas por unidades de tempo (SEGEL, 1979). No entanto, o aumento da temperatura acima de um determinado valor afeta consideravelmente a estrutura terciária da enzima, bem como a estabilidade do complexo enzima-substrato (CABRAL; BARROS; GAMA, 2003). O efeito da temperatura sobre a cinética de reação enzimática é resultado de dois eventos simultâneos. O primeiro evento é caracterizado pelo aumento na velocidade da reação catalisada em resposta ao aumento da temperatura do sistema. A elevação da temperatura provoca o aumento da energia cinética das moléculas componentes do sistema. Esse efeito é observado em um intervalo de

temperatura compatível com a estrutura espacial da enzima. No segundo evento, temperaturas mais altas levam à desnaturação enzimática por alterarem as ligações que conservam a estrutura tridimensional da enzima. Após o rompimento das ligações de hidrogênio, que são termolábeis, desencadeia-se uma série de alterações na estrutura enzimática, levando a uma nova conformação ou a um estado conformacional indefinido (ALMEIDA et al., 2008).

Da mesma forma, a influência da agitação (Q) aponta para um nível ótimo de atuação. Um dos principais fatores da velocidade aparente da reação é a relação entre a velocidade de difusão da enzima, uma proteína de alto peso molecular, no filme líquido em torno do substrato e a velocidade intrínseca de reação, que ocorrerá quando a enzima alcançar a superfície sólida do substrato. Há que se considerar também que para a reação intrínseca ocorrer, além de se transportar para a superfície do substrato a enzima devesse ainda se adsorver fisicamente a ele. Assim, em reator de batelada agitado, a velocidade de reação global é determinada pelas velocidades de três eventos em sequência: (i) velocidade de transferência de massa de enzima, (ii) velocidade de adsorção da enzima na superfície do substrato e (iii) velocidade de catálise da enzima (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003). Quanto maior a velocidade do fluido, menor a espessura do filme estagnado, portanto maior o coeficiente de transferência de massa do filme e, conseqüentemente, mais alta a velocidade de difusão. Entretanto, a agitação excessiva pode desativar as enzimas e reduzir o rendimento de conversão. Esse efeito é atribuído à força de cisalhamento gerada pelo agitador e pelo aprisionamento de bolhas de ar entre a superfície ar-líquido (INGESSON et al., 2001).

A Equação 10 apresenta o modelo codificado gerado pela análise de regressão:

$$Y = 99,10 - 4,87 \text{ pH} - 13,00 \text{ pH}^2 + 0,56 \text{ T} - 7,17 \text{ T}^2 - 3,10 \text{ Ag} - 6,05 \text{ Ag}^2 + 3,32 \text{ pH} \cdot \text{T} - 5,40 \text{ pH} \cdot \text{Ag} - 3,10 \text{ T} \cdot \text{Ag} \quad (10)$$

Onde: Y é a eficiência da hidrólise (%), pH, T e Ag são os valores codificados de pH, temperatura e agitação, respectivamente.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para verificar a validade do modelo matemático a 95% de confiança. A análise mostra a soma dos quadrados (SQ), os graus de liberdade (GL) e os quadrados médios (QM) do tratamento (termos do modelo), dos resíduos (diferença entre experimentos e termos do modelo) e do total (experimentos) e o F

calculado (quociente entre os quadrados médios dos tratamentos e dos resíduos) (Tabela 19).

Tabela 19. Análise de variância (ANOVA) das variáveis sobre a eficiência da sacarificação do amido de lema.

	SQ	GL	QM	F calculado
Regressão	9	4052,16	4336,65	60,97
Resíduo	10	355,62	71,12	
Falta de ajuste	5	157,12	31,42	
Erro puro	5	198,05	39,70	
Total	19	4407,77		

$R^2 = 0,92$; F tabelado = 3,02

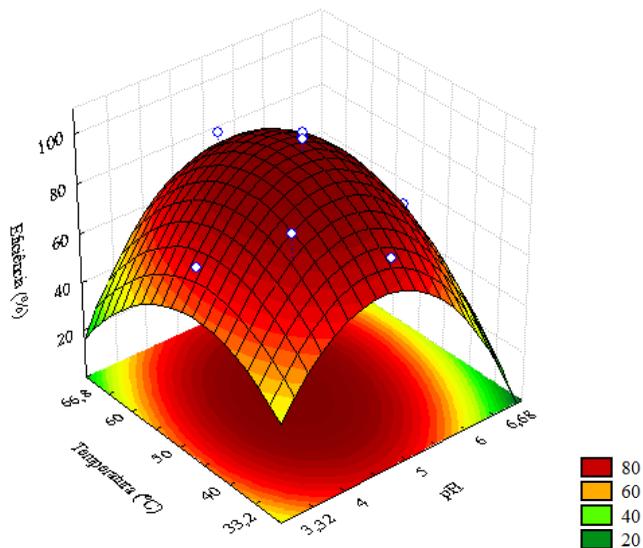
O valor de F reflete a razão da soma quadrática média devido à regressão pela soma quadrática média devido ao erro e indica a significância de cada fator do modelo. Na Tabela 19 o valor calculado de F foi 60,97, o qual é aproximadamente 20 vezes maior que o valor tabelado, mostrando que o modelo é estatisticamente significativo. O coeficiente de determinação (R^2) de 0,92 sugere que o modelo gerado (Equação 10) pode explicar 95% da variação total dos resultados.

A partir do modelo matemático foram traçados gráficos de superfície de resposta e de curvas de nível que apresentam a variação da eficiência da sacarificação em função do pH, da temperatura e da agitação (Figura 20 e Figura 21).

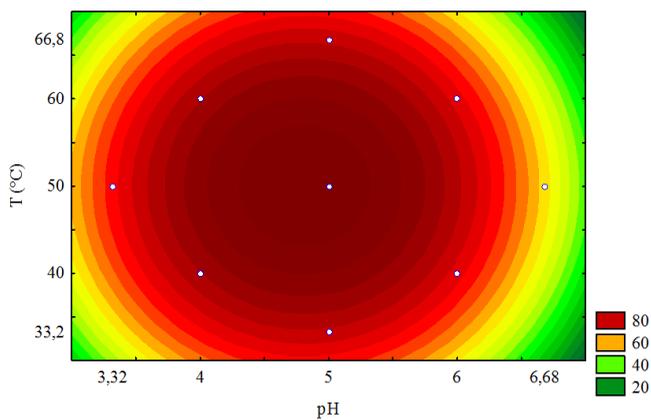
Em condições intermediárias do ensaio, ou seja, com pH entre 4,35 e 5,25; temperatura entre 45 e 55 °C e agitação entre 62,5 e 137,5 rpm, ocorreu a maior eficiência da sacarificação.

Tendo em vista a máxima eficiência aliada à economia e facilidade no processo, considerou-se como condição ótima de trabalho o pH de 5,0, a temperatura de 45 °C e a agitação de 100 rpm.

Figura 20. (a) Gráfico de superfície de resposta e (b) Gráfico de curva de nível, sobre a eficiência da sacarificação do amido de lemna em função do pH e da temperatura, com a agitação fixa no ponto central (100 rpm).

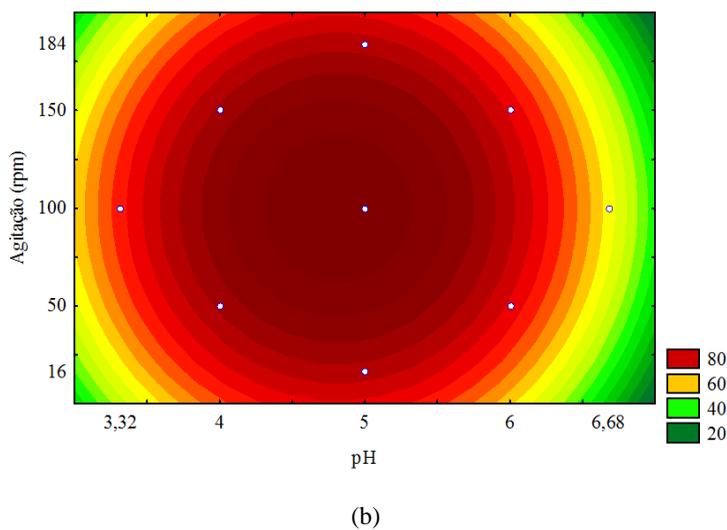
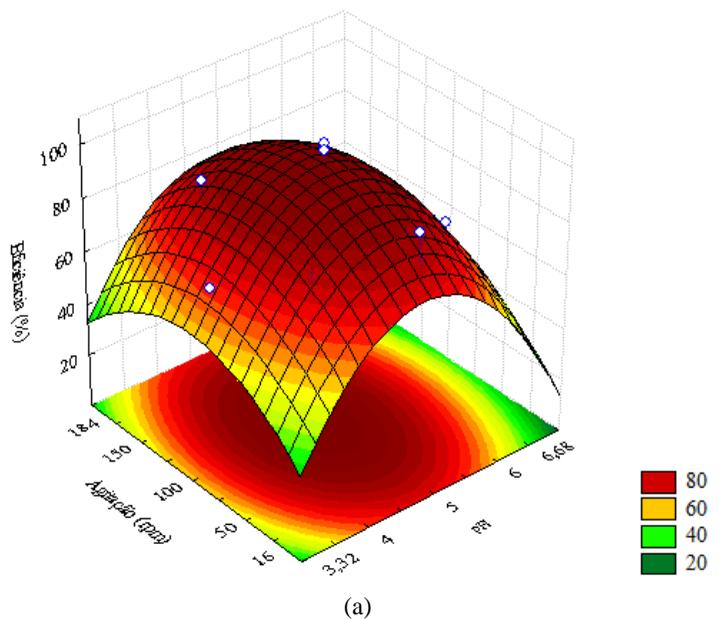


(a)



(b)

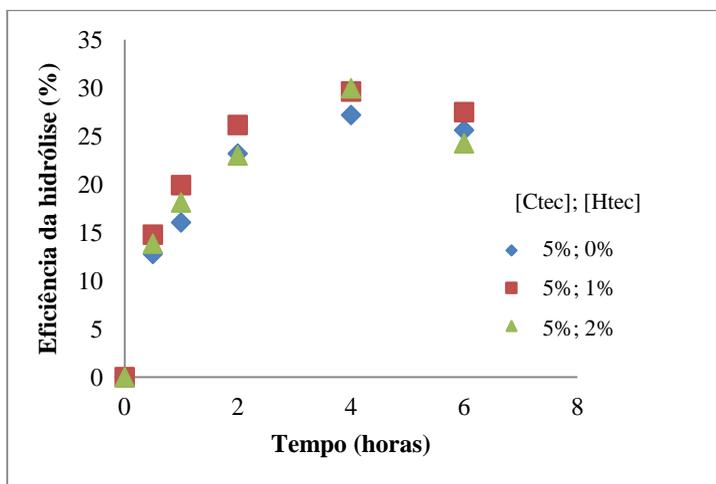
Figura 21. (a) Gráfico de superfície de resposta e (b) Gráfico de curva de nível, sobre a eficiência da sacarificação do amido de lenha em função do pH e da agitação, com a temperatura fixa no ponto central (50 °C).



3.3.4.2 Estudo cinético: Efeito da concentração das celulases

Após a otimização das condições da sacarificação do amido, realizou-se um estudo cinético para verificar a melhor concentração das celulases Ctec e Htec a serem utilizadas. Primeiramente, o estudo foi realizado para verificar a necessidade do uso da enzima complementar Htec. Para isso, a concentração da Ctec foi fixada em 5% e a concentração de Htec variou em 0; 1 e 2% (v m⁻¹). Os resultados obtidos em termos de eficiência (%) são apresentados na Figura 22.

Figura 22. Cinética da sacarificação da celulose de lemna com diferentes concentrações de Htec (0, 1 e 2%, v m⁻¹). pH 5,0; temperatura de 45 °C, agitação 100 rpm, concentração de Ctec 5% (v m⁻¹).

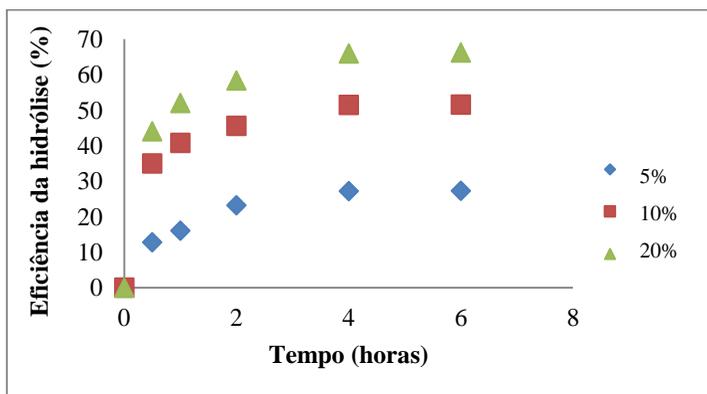


De acordo com a Figura 22 observa-se que após 4 horas de reação, nas concentrações de Htec de 0, 1 e 2% obteve-se uma eficiência de 27,2; 29,6 e 30,0%.

A Htec (hemicelulase) foi utilizada em conjunto com a Ctec por indicação do fabricante que alega melhora na hidrólise da celulose quando essas são usadas combinadas (NOVOZYMES, 2010). Porém, o seu uso nas condições testadas não apresentou efeito na eficiência da sacarificação. Este resultado indica que a lemna em estudo, apesar de não ter sido quantificada quanto ao teor de hemicelulose, deve apresentar valor baixo. Em estudo realizado por Ge et al. (2012), a *Lemna minor* apresentou deficiência em hemicelulose.

Após o estudo que avaliou o uso da enzima Htec, foi realizada uma avaliação cinética para verificar a concentração da Ctec que obtivesse maior eficiência na sacarificação. Os resultados obtidos em termos de eficiência (%) para as concentrações de Ctec de 5, 10 e 20% (v m⁻¹) são apresentados na Figura 23.

Figura 23. Cinética da sacarificação da celulose de lemna com diferentes concentrações de Ctec (5, 10 e 20%, v m⁻¹). pH 5,0; temperatura de 45 °C, agitação 100 rpm.



De acordo com a Figura 23 observa-se que após 4 horas de reação, nas concentrações de Ctec de 5; 10 e 20% obteve-se uma eficiência de 27,2; 51,5 e 66,2%. A maior eficiência (66,2%) foi atingida com 20% de Ctec para a sacarificação da celulose sem pré-tratamento e sem o uso de enzima complementar.

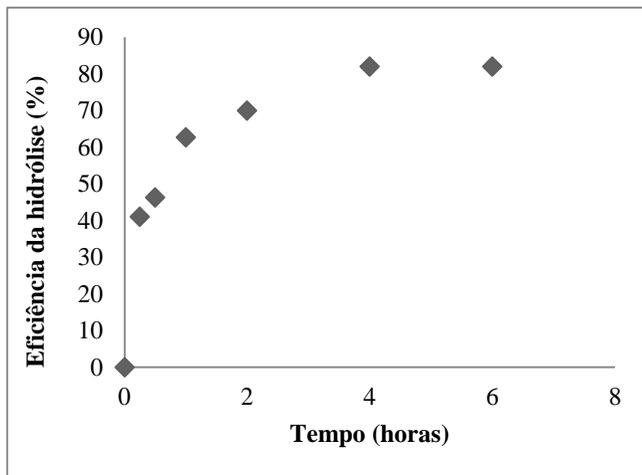
Os resultados mostram que ainda é necessário avaliar mais fatores para se obter uma eficiência maior na sacarificação da celulose, como o uso de pré-tratamentos. Zhao et al. (2015a) estudaram a sacarificação de lemnas utilizando um pré-tratamento de explosão a vapor. As melhores condições de pré-tratamento foram a 210 °C durante 10 minutos, o que permitiu grandes reduções nas concentrações de enzimas necessárias para a sacarificação. A quantidade de celulase foi reduzida de 100 para 20 U g⁻¹ de substrato, e amilase foi reduzida de 100 para 2 U g⁻¹ de substrato.

3.3.4.3 Estudo cinético: sacarificação simultânea do amido e da celulose

A sacarificação do amido e da celulose da lemna foi realizada simultaneamente nas condições de pH 5,0; temperatura de 45 °C, agitação

100 rpm, concentração de amiloglucosidase 1%, pectinase 0,3% e Ctec 20% (v m⁻¹). A eficiência foi de 82,1% após 4 horas de reação (Figura 24).

Figura 24. Eficiência da hidrólise enzimática simultânea do amido e celulose de lenha não tratada.



A concentração de glicose após 4 horas foi de 29,1 g L⁻¹. O balanço de massa teórico indica que 1 mol de glicose é convertido a 2 moles de etanol e 2 moles de gás carbônico. O rendimento teórico é de 51,1% sobre a massa da glicose. Então, a sacarificação simultânea do amido e da celulose de lenha geraria, nas condições otimizadas, após 4 horas, uma concentração teórica máxima de 14,8 g L⁻¹ de etanol. Levando em consideração a eficiência da sacarificação do amido (99%) e a eficiência da celulose (66%), cerca de 11 g L⁻¹ de etanol seria referente à fração amilácea e 4 g L⁻¹ à fração celulósica.

3.3.5 Atividade enzimática

Para acompanhar as possíveis variações nos valores das atividades enzimáticas nas condições do processo em relação às condições da metodologia (item 3.2.3), foram feitas análises nas principais enzimas responsáveis pela hidrólise do amido, a α -amilase (Termamyl 2X) e a amiloglucosidade (Spirizyme Fuel), e da celulose, a celulase Cellic Ctec2.

A atividade 1 foi realizada com valores de pH e temperatura segundo a metodologia e a atividade 2 foi realizada com os valores otimizados para o processo de hidrólise (Tabela 20).

Tabela 20. Valores de pH e temperatura utilizados para a determinação da atividade enzimática da α -amilase, amiloglucosidade e celulase segundo metodologia e nas condições otimizadas do processo de hidrólise.

Enzimas	Metodologia		Condições do processo	
	pH	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)
α -amilase	6,0	60	6,0	65
Amiloglucosidase	4,5	40	5,0	45
Celulase	4,8	50	5,0	45

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Atividade enzimática da α -amilase, amiloglucosidade e celulase segundo metodologia (Atividade 1) e nas condições otimizadas do processo de hidrólise (Atividade 2).

Atividade (U/mL)	α -amilase*	Amiloglucosidase*	Celulase*
Atividade 1	824,56 \pm 6,93 ^a	617,21 \pm 7,28 ^b	44,31 \pm 5,07 ^c
Atividade 2	829,25 \pm 6,12 ^a	595,55 \pm 5,64 ^b	39,63 \pm 1,55 ^c

U= unidade de atividade enzimática

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

Os valores das atividades obtidas 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 amiloglucosidase e a celulase, com condições ótimas distintas, foram adicionadas em uma única etapa. Assim, o pH e a temperatura utilizados não tiveram influência negativa sobre a atividade das enzimas mesmo trabalhando fora de suas condições ótimas, como é o caso principalmente da amiloglucosidase.

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 dificulta a comparação dos resultados com dados da literatura.

CAPÍTULO 4 – FERMENTAÇÃO E SACARIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DA BIOMASSA DE LEMNA (*Landoltia punctata*) SUBMETIDA AO PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO

4.1 INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis são cada vez mais procurados como alternativas aos combustíveis fósseis, devido aos seus níveis elevados de sustentabilidade e a sua contribuição para a redução das emissões de gases do efeito estufa. Atualmente, os biocombustíveis correspondem a 10,2% da matriz energética mundial (IEA, 2016).

A lemna tem sido proposta como uma matéria-prima potencial para a produção de biocombustíveis, devido à sua elevada proporção de hidratos de carbono, baixo teor de lignina e alta produtividade (LANDOLT; KANDELER, 1987; JARVIS; FORSYTH; HENRY, 1988). Além disso, a lemna é geralmente um subproduto do tratamento de efluentes que não compete por terras agricultáveis, o que torna ainda mais interessante a sua valorização por meio da produção de biocombustíveis.

Estudos têm demonstrado o potencial da conversão da biomassa de lemna a etanol. Altas conversões do amido a etanol têm sido alcançadas seguindo diferentes tratamentos enzimáticos (CHENG; STOMP, 2009; CHEN et al., 2012). Uma estimativa do rendimento de etanol a partir da lemna *Spirodela polyrrhiza* foi de 6420 L ha⁻¹ ano⁻¹ com base no rendimento de amido de 9420 kg ha⁻¹ ano⁻¹, o que é 50% maior do que a produção de etanol à base de milho (XU et al., 2011).

Altos rendimentos de glicose foram obtidos também a partir da fração celulósica usando o pré-tratamento de explosão a vapor e reduzidos níveis de coquetéis enzimáticos (ZHAO et al., 2012; ZHAO et al., 2015a). Apesar do pré-tratamento melhorar a eficiência da hidrólise enzimática, sabe-se que na explosão a vapor forma-se grande quantidade de inibidores indesejáveis na fermentação (PEDERSEN; MEYER, 2010). Já o tratamento hidrotérmico tem sido relatado como um tratamento que tem significativamente menor impacto ambiental, menor investimento de capital, evita a formação de produtos químicos e possui baixa geração de subproduto (YANG; WYMAN, 2008).

A inspeção da literatura revela que, até o momento, inexistem trabalhos sobre o uso de pré-tratamento hidrotérmico em lemnas. Diante da possibilidade de aumentar a conversão da fração celulósica em etanol e diminuir a quantidade de enzima a ser utilizada futuramente, bem como disponibilizar dados inéditos à literatura, este capítulo avaliou a produção

de etanol por SFS a partir de lemna (*Landoltia punctata*) submetida ao pré-tratamento hidrotérmico.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo referente a esse capítulo foi realizado durante o período de doutorado sanduíche no *Institute of Food Research* (IFR) em Norwich, Reino Unido.

4.2.1 Matéria-prima

A espécie de lemna utilizada nesse estudo foi *Landoltia punctata* (ver item 2.2.2), excedente de uma unidade piloto de tratamento de esgoto sanitário oriundo de condomínios residenciais. Essa unidade se localiza no setor experimental do Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU) e Laboratório de Resíduos Sólidos (LARESO), do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENS), nas dependências do campus universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, na cidade de Florianópolis – SC (ver item 3.2.1).

As lemnas foram coletadas das lagoas durante os meses de julho a novembro de 2013, com temperatura média de 20,1 °C (INMET, 2016). Após a coleta, a biomassa foi lavada com água de rede de abastecimento, seca a 55 °C por 24 horas e triturada. Posteriormente, ela foi embalada e mantida sob refrigeração (7 ± 2 °C) até seu transporte para o IFR.

4.2.1.1 Preparo e caracterização da biomassa

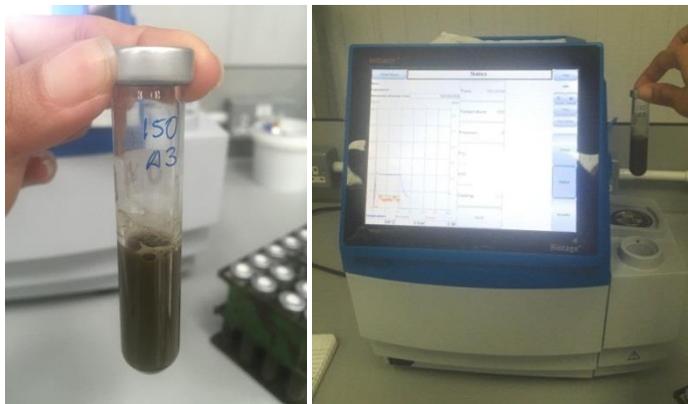
A lemna foi moída em moinho criogênico modelo Spex Modelo 6700 (Spex Industries, Inc., USA). Para isso, cerca de 3 gramas de lemna foram colocadas em tubos de policarbonato (*vials*) próprios para o moinho. Primeiramente, os tubos foram colocados em imersão de nitrogênio líquido por 6 minutos. Após esse processo de pré-refrigeração, os tubos foram colocados no moinho por 5 minutos.

A biomassa seca e moída (BSM) foi então caracterizada quanto ao seu teor de umidade e perfil de monossacarídeos.

4.2.2 Pré-tratamento hidrotérmico

Alíquotas de BSM diluídas em água milli-Q (5% m v⁻¹) foram submetidas ao pré-tratamento hidrotérmico, utilizando o equipamento Biotage Initiator Microwave Synthesiser (Figura 25).

Figura 25. Pré-tratamento hidrotérmico da biomassa de lemna.



As temperaturas testadas foram 130, 150, 160, 170, 180, 190, 200 e 210 °C por 10 minutos. As temperaturas de 220 e 230 °C foram avaliadas em 210 °C por 20 e 40 minutos, respectivamente, levando-se em conta o fator de severidade de cada condição (WOOD et al., 2016). Os fatores de severidade foram calculados segundo a Equação 11 (OVEREND; CHORNET; GASCOIGNE, 1987).

$$S = \text{Log}_{10}[t \times \exp((T - 100)/14,75))] \quad (11)$$

Onde t é o tempo de pré-tratamento e T é a temperatura empregada no processo.

Ao final do pré-tratamento, os frascos contendo meios reacionais (licor + biomassa pré-tratada) foram centrifugados por 30 minutos a 3000 rpm para coleta dos licores (Centrífuga 5810 R, Eppendorf Ltd., Stevenage, Reino Unido). Os licores foram transferidos para Eppendorfs e mantidos em freezer (-18 °C) para análises posteriores. As biomassas pré-tratadas (BPT) foram lavadas com água milliQ quatro vezes. Para isso, transferiu-se a biomassa para tubos Falcon de 50 mL, completou-se o volume para 30 mL com água milli-Q, centrifugou-se (3000 rpm /

30 min) e eliminou-se a água de lavagem. Os tubos Falcon com a BPT foram mantidos em freezer (-18 °C) até serem requeridos.

A BPT foi analisada quanto ao seu perfil de açúcares e também foi submetida à análise de microscopia. Os licores foram analisados quanto ao seu perfil de açúcares.

4.2.3 Micro-organismo

A levedura utilizada na SFS foi a *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 2826 (Coleção Nacional de Culturas de Leveduras, Norwich, Reino Unido). Elas são mantidas sob refrigeração (4 °C) em meio sólido inclinado, cujo a composição é apresentada na Tabela 22 (ELLISTON et al., 2013).

Tabela 22. Composição do meio de cultura para manutenção da *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 2826.

Componente do meio de cultura	Concentração (%)
Glicose	1,0
Peptona	0,5
Extrato de levedura	0,3
Extrato de malte	0,3
Ágar	2,0

4.2.3.1 Preparação do inóculo

A cultura estoque foi ativada através do repique e transferida para frascos contendo 10,0 mL de meio de cultura líquido YNB (do inglês, *Yeast Nitrogen Base*) seguido de incubação a 25 °C por 3 dias.

Após esse período, a levedura foi lavada para retirar possíveis açúcares residuais. Para isso, primeiramente os conteúdos dos frascos foram transferidos para tubo Falcon de 50 mL, centrifugados (2000 rpm / 3 minutos) e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 30 mL de meio YNB, agitou-se e centrifugou-se novamente a 2000 rpm por 3 minutos. Após descarte do sobrenadante pela terceira vez, adicionou-se 30 mL de meio YNB tamponado com acetato de sódio pH 5,0 e homogeneizou-se. O conteúdo do tubo Falcon foi transferido para balão volumétrico 50 mL e tarado com YNB tamponado. Uma amostra do inóculo foi coletada e submetida à análise de quantificação celular. Posteriormente, a enzima celulase comercial Cellic Cetec 2 (Novozymes) foi adicionada à uma

carga de 50 FPU/g de substrato. Todo o procedimento de preparo do inóculo de fermentação foi realizado em ambiente estéril.

4.2.4 Sacarificação e Fermentação simultânea - SFS

A SFS foi realizada em microtubos de 1 mL com tampas de rosca, dispostos em placas com capacidade para 96 microtubos (Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, United Kingdom), segundo metodologia descrita por Elliston et al. (2015a) (Figura 26).

Figura 26. Placas com microtubos de 1 mL utilizadas na fermentação e sacarificação simultânea da biomassa de lemna.



Aos tubos Falcon contendo a biomassa pré-tratada foi adicionado 30 mL de água milliQ. Para garantir a homogeneidade da solução no momento da sua transferência, os tubos foram submetidos à agitação constante. Um total de 2,5% ($m v^{-1}$) de cada pré-tratado foi adicionado aos microtubos de 1 mL, juntamente com um volume de YNB calculado para assegurar o volume final (0,84 mL) depois de todas as adições, incluindo leveduras e enzima, conforme necessário. A concentração de enzima foi de 50 FPU/g de enzima celulase Cellic™ CTec2 (Novozymes Corp, Bagsvaerd, Dinamarca) e 10% (v/v) de inóculo *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 2826. A cada tubo de 1 mL foi adicionado duas esferas de vidro de 2,5 mm (Thistle científicos, Glasgow, Reino Unido) para ajudar na agitação. Controles foram realizados para tirar as possíveis interferências do substrato, enzimas e levedura. Todas as amostras foram então incubadas a 25 °C em *shaker* (Infors AG, Basileia, Suíça) a 120 rpm por 120 horas. As placas contendo os microtubos foram colocadas no

shaker de forma que os tubos ficassem na horizontal para assegurar uma boa agitação (Figura 27).

Figura 27. Fermentação e sacarificação simultânea da biomassa de lenha pré-tratada.



Após 120 horas, as amostras foram centrifugadas (2500 rpm/20 min) e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos. A fim de parar a reação, os sobrenadantes foram aquecidos a 100 °C por 5 minutos em bloco quente.

4.2.5 Metodologia descritiva

4.2.5.1 Umidade

O teor de umidade da BSM antes do pré-tratamento (1 g em triplicata) foi determinada usando uma balança Mettler Toledo LP16 infravermelho Secador (Mettler Toledo Ltd., Beaumont Leys, Leicester, Reino Unido).

4.2.5.2 Análise de açúcares por cromatografia gasosa (GC)

A quantificação do teor de monossacarídeos (glicose, xilose, arabinose, galactose, manose, fucose) da BSM antes do pré-tratamento e BPT após as lavagens foi avaliada por cromatografia gasosa segundo Blakeney et al. (1983). As amostras (3 mg), em triplicata, foram tratadas com 200 μ L de 72% H_2SO_4 ($m\ m^{-1}$) por 3 horas em temperatura ambiente. Depois de transcorrido o tempo da hidrólise ácida, foi adicionado 2,2 mL

de água, diluindo para 1 mol L⁻¹ de H₂SO₄. Para completa hidrólise dos oligômeros, os tubos foram incubados a 100 °C por 2,5 horas. As amostras de BPT também foram hidrolisadas somente com 1 mol L⁻¹ de H₂SO₄ (omitindo a hidrólise com 72% H₂SO₄), o que permite que o conteúdo aproximado de amido e celulose possa ser determinado. Esse método fornece uma estimativa útil do conteúdo de amido (SAEMAN et al., 1954). Os licores foram analisados pelo método da hidrólise a 1 mol L⁻¹ de H₂SO₄. 2- desoxiglucose foi adicionado como padrão interno. Após a redução e acetilação, os monômeros de açúcares foram analisados por cromatografia gasosa num sistema Perkin-Elmer Autosystem XL GC (Perkin-Elmer, Seer Green, Bucks., Reino Unido) contendo coluna Rtx®-225 (Thames Restek UK Ltd, Saunderton, UK). O tempo de corrida foi de 50 minutos, a temperatura de rampa, 250 °C / min e o detector utilizado foi de ionização de chama (FID).

4.2.5.3 Microscopia da BPT

A BPT após as lavagens foram secas com etanol (duas vezes) e imersas em reagente CDTA (ciclohexilenodinitrilotetra acético), incluindo 0,05 mol L⁻¹ Na₃H₁ CDTA e 5 mmol L⁻¹ Na₂S₂O₅, pH 7, durante 4 dias para a degradação dos tecidos (SELVENDRAN; O'NEILL, 1987). Os tecidos foram corados com uma solução de Lugol (20 kg m⁻³ KI com iodo (0.2 kg m⁻³)) para realçar a presença de amido. As amostras foram observadas por microscópio manual (BX60 da Olympus, Japão).

4.2.5.4 Determinação da matéria seca dos pré-tratados

Para determinar a recuperação de material de cada pré-tratado, foram transferidos 0,84 mL da solução contendo BPT + água Milli-Q a 2,5% (m v⁻¹) para microtubos de 1 mL previamente pesados. Os microtubos foram dispostos nas placas e essas foram mantidas em liofilizador (Lyotrap LTE scientific Ltd., Reino Unido) até completa secagem. Em seguida, as placas foram transferidas para o dessecador e após atingirem a temperatura ambiente, cada microtubo foi pesado, determinando-se, assim, a matéria seca das amostras.

4.2.5.5 *Quantificação celular*

As células foram quantificadas utilizando o leitor NucleoCounter® YC-100™ (ChemoMetec, Allerød, Dinamarca). A quantificação das células totais foi realizada pela suspensão de 10 µL da solução do inóculo em 490 µL de tampão de lise e posterior leitura no leitor de contagem de células. A quantificação das células mortas foi realizada pela leitura direta da solução do inóculo, sem diluir. Para quantificar o total de células viáveis do inóculo, calculou-se a diferença entre o número de células totais e o número de células mortas.

4.2.5.6 *Avaliação de etanol da SFS*

A avaliação de etanol da SFS foi realizada segundo os métodos descritos por Elliston et al. (2013). O sobrenadante da SFS foi filtrado usando filtros de seringa de 0,2 µm (Fisher Scientific UK Ltd., Loughborough, Reino Unido) em *vials* de 300 µL (Essex Scientific Laboratory Supplies Ltd., Hadleigh, Reino Unido). As análises de etanol foram realizadas por HPLC LC Série 200 (Perkin Elmer, Seer Green, UK) equipado com um detector de índice de refração. A coluna utilizada foi uma Aminex HPX-87p de análise de hidratos de carbono (Bio-Rad Laboratories Ltd, Hemel Hempstead, Reino Unido), operando a 65 °C com água ultrapura como fase móvel, a uma vazão de 0,6 mL/min.

A conversão em etanol (%m m⁻¹) foi calculada de acordo com a Equação 12.

$$\text{Conversão em etanol (\%)} = \frac{\text{etanol produzido (g)}}{\text{etanol teórico (g)}} \times 100 \quad (12)$$

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 **Caracterização da BSM**

O teor de umidade da BSM foi de 7,2% (± 0,8), valor este dentro da faixa de 3 a 14% relatado por Landolt e Kandeler (1987). A composição total de monossacarídeos da BSM foi analisada e os resultados, em base seca, são mostrados na Tabela 23.

Tabela 23. Composição de monossacarídeos de *L. punctata* (g kg⁻¹).

Amostra	Hidrólise	Ra	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glc	GalA	Total
BSM	72%	6,8	2,2	12,0	29,3	7,6	23,2	364,8	64,0	509,9
	H ₂ SO ₄	(±0,9)	(±0,3)	(±1,0)	(±1,5)	(±1,1)	(±1,5)	(±30,9)	(±4,6)	(±41,9)
	1 mol L ⁻¹	5,5	1,9	12,4	22,0	4,2	20,6	283,0		
	H ₂ SO ₄	(±0,9)	(±0,2)	(±2,4)	(±2,8)	(±0,3)	(±1,5)	(±32,3)		

Ra: ramnose; Fuc: fucose; Ara: arabinose; Xil: xilose; Man: manose; Gal: galactose; Glc: glicose; GalA: ácido galacturônico.

A lemna apresentou um total de 51,0% de carboidratos. O monossacarídeo predominante foi a glicose (364,8 g kg⁻¹), seguido do ácido galacturônico (64,0 g kg⁻¹), xilose (29,2 g kg⁻¹), galactose (23,2 g kg⁻¹), arabinose (12,0 g kg⁻¹), manose (7,6 g kg⁻¹), ramnose (6,8 g kg⁻¹) e fucose (2,2 g kg⁻¹). Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por Zhao et al. (2014), que analisando *Lemna minor* encontraram os teores de 331,3 g kg⁻¹; 96,1 g kg⁻¹; 46,4 g kg⁻¹; 16,3 g kg⁻¹; 8,0 g kg⁻¹; 7,1 g kg⁻¹; 4,4 g kg⁻¹ e 2,3 g kg⁻¹ para os mesmos carboidratos.

A grande quantidade de ácido galacturônico e a pequena quantidade de xilose indica que a biomassa de lemna contém pouca hemicelulose (ZHAO et al., 2014). O resultado da hidrólise 1 mol L⁻¹ H₂SO₄ no que se refere ao teor de glicose, indica um teor de amido aproximado, sendo este de 28,3% (m m⁻¹). A diferença entre o teor de glicose na hidrólise 72% e 1 mol L⁻¹ H₂SO₄ indica que a lemna possui aproximadamente 8,2% (m m⁻¹) de celulose.

Dos monossacarídeos analisados, glicose, galactose e xilose são relatados como açúcares fermentescíveis (DELGENES, MOLETTA; NAVARRO, 1996). Esses três açúcares são responsáveis por 82% dos açúcares totais. A proporção elevada de açúcares fermentescíveis com um baixo nível de lignina apoia as razões que a lemna pode ser uma matéria-prima útil para a produção de biocombustíveis.

4.3.2 Recuperação do material após pré-tratamento hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico resultou em perda de massa, como é típico nas biomassas pré tratadas (KABEL et al., 2007; LU; ZHANG; ANGELIDAKI, 2009; DIAZ et al., 2010; MATHEW et al., 2011; ZHU et al., 2011; ZHAO et al., 2015b). O peso recuperado variou de 46,5 a 69,2% (m m⁻¹) do material de partida (Tabela 24).

Tabela 24. Recuperação da matéria seca após pré-tratamento hidrotérmico.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Fator de severidade	Pressão (MPa)	Recuperação (%)
UT	-	-	-	100
130	10	1,9	0,1	69,2
150	10	2,5	0,4	65,3
160	10	2,8	0,7	63,7
170	10	3,1	1,0	60,4
180	10	3,4	1,3	57,5
190	10	3,6	1,5	53,8
200	10	3,9	1,6	50,9
210	10	4,2	1,7	49,5
210	20	4,5	1,7	46,5
210	40	4,8	1,7	48,8

UT: biomassa não tratada.

Isso ocorre como consequência da repartição e solubilização dos polissacarídeos não-celulósicos e outras substâncias de peso molecular baixo (DIAZ et al., 2010; ROCHA et al., 2012). Em geral, a solubilização aumenta à medida que o índice de severidade aumenta. A maior proporção de materiais solúveis em água foi no pré-tratamento a 220 °C, indicando que essas condições correspondem a um meio eficaz de solubilização da biomassa de lemna.

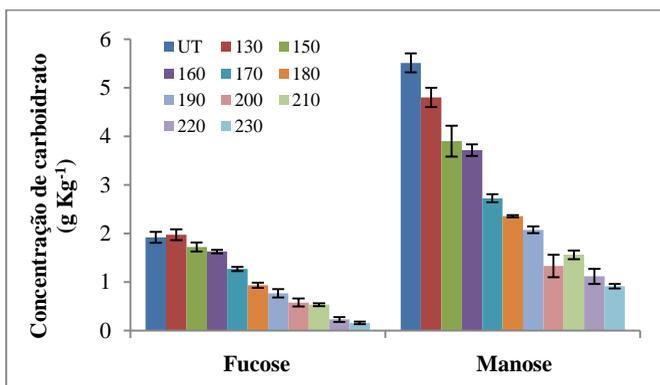
Em comparação, Zhao et al. (2015b) observaram em lemnas (*Lemna minor*) submetidas a explosão a vapor a maior proporção de materiais solúveis em 210 °C. Na temperatura de 230 °C houve um pequeno aumento dos materiais insolúveis em água, provavelmente por um decréscimo do material solúvel devido à volatilização. A quantidade de matéria solúvel em água foi maior no presente estudo comparado ao estudo de Zhao et al. (2015b), provavelmente devido ao maior teor de amido, já que uma grande parte do material solubilizado foi atribuída ao amido, como poderá ser observado nas análises seguintes.

4.3.3 Efeito do pré-tratamento nos teores de açúcares da BPT

A composição de hidratos de carbono da BPT foi quantificada a fim de avaliar o impacto do pré-tratamento hidrotérmico nessa

composição. À medida que a temperatura do pré-tratamento hidrotérmico aumentou, a fucose, ramnose, arabinose, galactose e xilose foram removidas da fração insolúvel em água com mais intensidade, como pode ser observado na Figura 28 e Figura 29. Esse comportamento é típico das biomassas pré-tratadas, já que o tratamento proporciona a repartição e solubilização desses polissacarídeos (WOOD et al., 2014, ELLISTON et al., 2015b; WOOD et al., 2015).

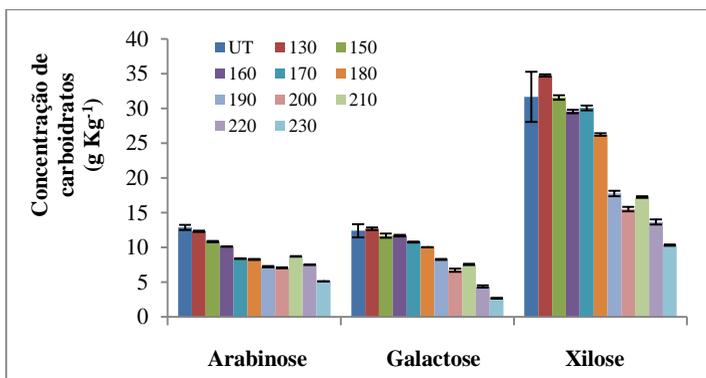
Figura 28. Teores de fucose e ramnose (g Kg^{-1}) da BPT nas diferentes temperaturas e da biomassa não tratada (UT).



UT: biomassa de lemna não tratada

*As barras representam o desvio padrão entre as médias.

Figura 29. Teores de arabinose, galactose e xilose (g Kg^{-1}) da BPT nas diferentes temperaturas e da biomassa não tratada (UT).



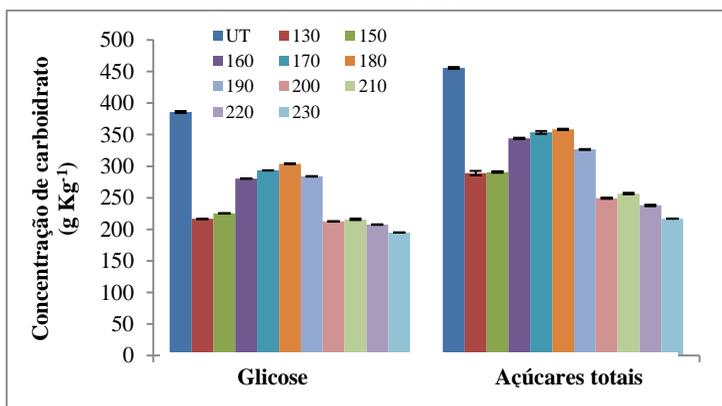
UT: biomassa de lemna não tratada

*As barras representam o desvio padrão entre as médias.

A proporção de fucose, ramnose, galactose, xilose e arabinose que se manteve na fração insolúvel em água, após o tratamento a 230 °C, foi de 8,3; 16,5; 21,6; 32,6 e 39,7% (m m⁻¹), respectivamente (em relação à biomassa não tratada).

O teor de glicose na biomassa pré-tratada aumentou até a temperatura de 180 °C, em que seu valor foi máximo (303,9 g Kg⁻¹) e nas temperaturas superiores a 180 °C, o teor de glicose começou a diminuir (Figura 30).

Figura 30. Teores de glicose e açúcares totais (g Kg⁻¹) da BPT nas diferentes temperaturas e da biomassa não tratada (UT).



UT: biomassa de lemna não tratada

*As barras representam o desvio padrão entre as médias.

Nota-se que houve um aumento de 28,7% no teor de glicose do tratamento a 180 °C em relação ao tratamento menos severo (130 °C). Nos tratamentos com temperaturas acima de 180 °C o teor de glicose diminuiu possivelmente devido à formação de produtos de desidratação dos carboidratos (furfural e hidroximetilfurfural) comum a altas temperaturas (HSU, 1996).

A biomassa não-tratada apresentou 21,3% a mais de glicose que a biomassa tratada a 180 °C, devido a presença da sua fração amilácea na fase sólida. No caso das biomassas pré-tratadas grande parte do amido foi solubilizado para a fase líquida e, portanto, não contabilizada nesse experimento.

4.3.4 Efeito do pré-tratamento nos teores de açúcares dos licores

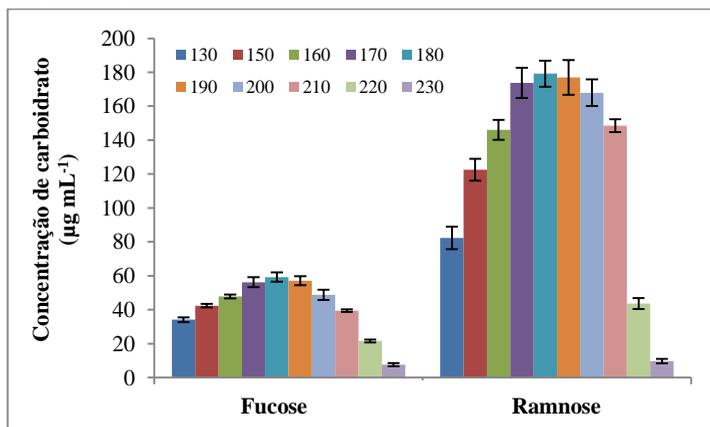
A análise de açúcares dos licores foi realizada pela metodologia da hidrólise 1 mol L^{-1} de H_2SO_4 .

À medida que a temperatura do pré-tratamento hidrotérmico aumentou, os teores de fucose, ramnose, arabinose, galactose e xilose aumentaram até certo ponto e depois começaram a decair (Figura 31 e Figura 32).

A xilose, que é o principal constituinte da hemicelulose, obteve sua maior remoção da fração insolúvel em água na temperatura de $200 \text{ }^\circ\text{C}$, mostrando que o pré-tratamento hidrotérmico foi mais eficiente na remoção da hemicelulose nessa temperatura. Zhao et al. (2015b) obtiveram a melhor remoção de xilose a $190 \text{ }^\circ\text{C}$.

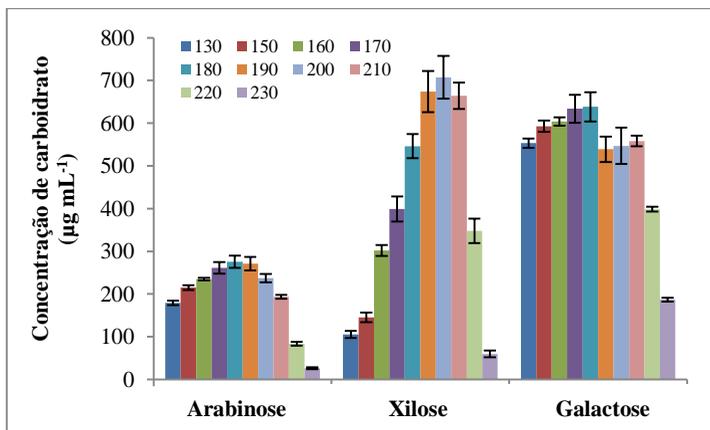
A glicose foi o açúcar predominante em todos os tratamentos. Neste método de avaliação, usando somente a hidrólise 1 mol L^{-1} H_2SO_4 , hidrolisa-se a glicose não celulósica, tal como o amido. Pode-se observar que o teor de glicose aumentou à medida que a temperatura do pré-tratamento aumentava até atingir seu máximo na temperatura de $210 \text{ }^\circ\text{C}$. A partir dessa temperatura, o teor de glicose começou a decair (Figura 33).

Figura 31. Teores de fucose e ramnose ($\mu\text{g/mL}$) dos licores submetidos à análise de açúcares por GC (hidrólise 1 mol L^{-1} H_2SO_4).



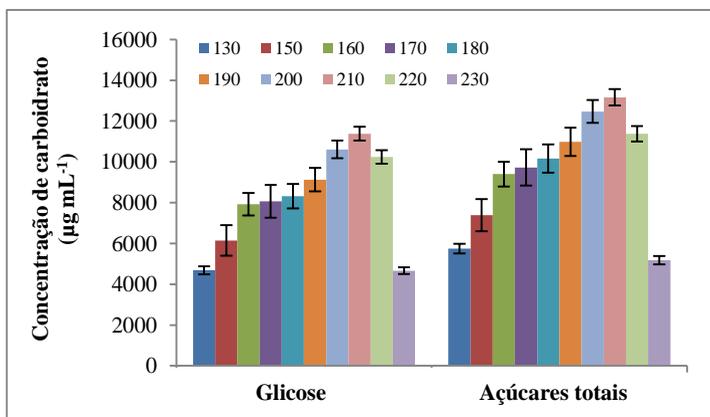
*As barras representam o desvio padrão entre as médias.

Figura 32. Teores de arabinose, xilose e galactose ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos licores submetidos à análise de açúcares por GC (hidrólise $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$).



*As barras representam o desvio padrão entre as médias.

Figura 33. Teores de glicose e açúcares totais ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos licores submetidos à análise de açúcares por GC (hidrólise $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$).



*As barras representam o desvio padrão entre as médias.

Zhao et al. (2015b) também observaram que o teor de glicose aumentou até atingir seu máximo na temperatura de $210 \text{ }^\circ\text{C}$ e depois decaiu drasticamente. Os resultados demonstram a solubilização do amido durante o pré-tratamento hidrotérmico. O movimento de açúcares da fração insolúvel para a fração solúvel em água teve a tendência de aumentar à medida que a temperatura aumentou de 130 para cerca de 200

°C em geral. No entanto, acima dessas temperaturas os açúcares diminuíram, possivelmente devido à degradação. A degradação de açúcares não celulósicos é consistente com os estudos de pré-tratamento sobre a biomassa lignocelulósica (KABEL et al., 2007; WALDRON, 2010).

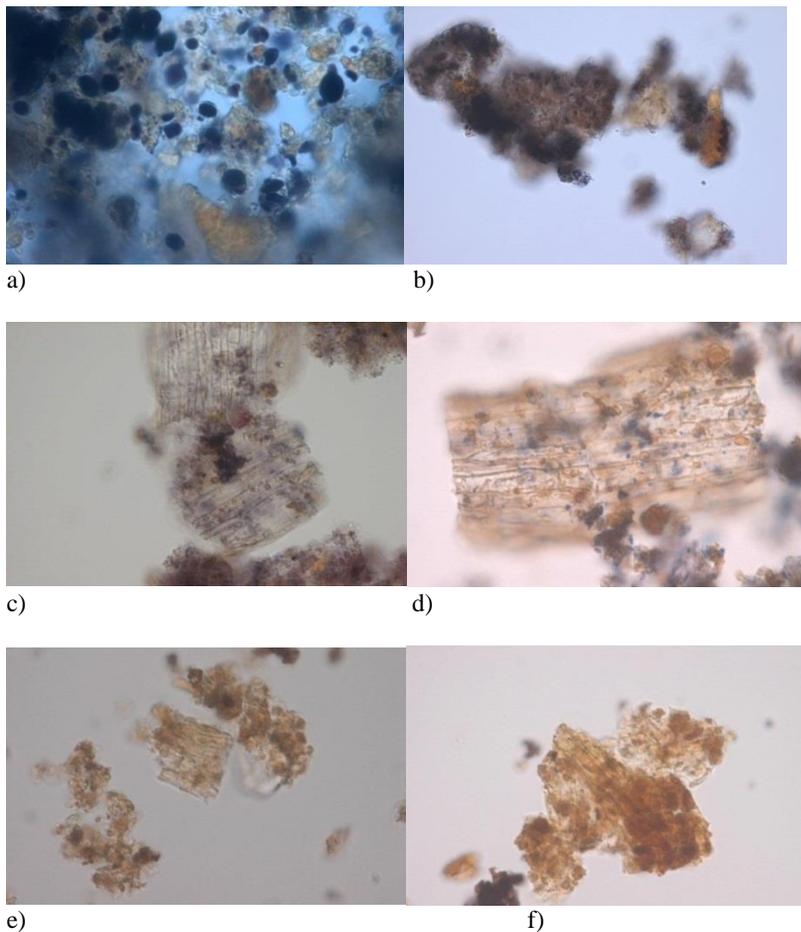
4.3.5 Impacto visual do pré-tratamento hidrotérmico nos tecidos de lemna

A extensão da remoção de amido depois do pré-tratamento foi avaliada por microscopia (Figura 34 a-f).

O pré-tratamento hidrotérmico teve uma importante ação sobre a solubilização do amido. Após coloração com Lugol foi observada uma grande quantidade de grânulos de amido na biomassa não-tratada (Figura 42a; os grânulos de amido estão manchados de preto). O aumento da temperatura resultou num aumento da solubilização do amido e como consequência sua remoção da fase insolúvel em água. Pode-se observar, nas temperaturas mais baixas do pré-tratamento (130 a 190 °C), a presença de grânulos de amido incorporado às células. Nas temperaturas mais elevadas (210 e 230 °C), a presença dos grânulos de amido diminuiu ao ponto de não serem mais observados.

Vale ressaltar que o objetivo desse estudo foi analisar o efeito do pré-tratamento na fração celulósica da biomassa de lemna. Por isso, para fins de estudo se desprezou a fração amilácea a fim de avaliar a conversão de etanol apenas da fração celulósica. Porém, para a produção de etanol em larga escala a partir da biomassa de lemna, sugere-se aproveitar também a fração amilácea nas condições otimizadas no Capítulo 3. Sendo assim, o pré-tratamento seria realizado na biomassa de lemna “*destarched*”, ou seja, desprovida de amido pela sua hidrólise enzimática prévia. Posteriormente, este hidrolisado seria incorporado na SFS, contribuindo para o aumento no teor de etanol.

Figura 34. Microscopia da biomassa de lenha pré-tratada. Tecido foi corado com iodo (40x). a) tecido não tratado. b) 130 °C. c) 170 °C. d) 190 °C. e) 210 °C. f) 230 °C.

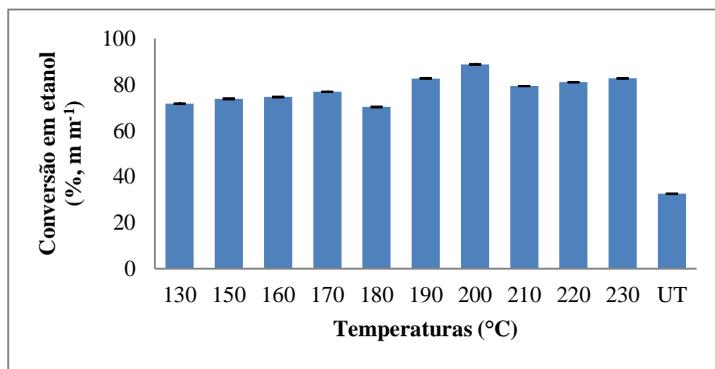


4.3.6 Produção de etanol por SFS de lenha pré-tratada

A adequação da biomassa para a produção de bioetanol não é apenas dependente da quantidade de açúcar disponível para a fermentação, mas, além disso, o efeito de outros compostos libertados durante o processamento (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000). Para entender o efeito do pré-tratamento sobre a adequação do substrato

para a fermentação, as amostras pré-tratadas hidrotêrmicamente foram expostas a SFS e suas conversões em etanol quantificadas (Figura 35).

Figura 35. Conversão em etanol (% m^{-1}) da biomassa de lenha pré-tratada hidrotêrmicamente submetida à SFS.



UT: biomassa não tratada

Sob as condições mais eficazes (200 °C, 10 min), um máximo de 88,81% de conversão em etanol foi atingido. Isso representou um aumento de 63% em relação à biomassa não tratada. À medida que a severidade do pré-tratamento hidrotérmico aumentou, a conversão em etanol teve a tendência de aumentar até certo ponto (200 °C, 10 min). No entanto, em severidades maiores (200 °C, 10 min) essa conversão começou a decair. A decomposição térmica da glicose e a produção de inibidores da fermentação a temperaturas superiores a 200 °C é a provável razão para esta tendência (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000; JACQUET et al., 2011). Observa-se que o tratamento a 180 °C desviou a tendência e obteve o menor valor de conversão entre as biomassas pré-tratadas. A essa temperatura foi possível detectar certa quantidade de açúcares não-celulósicos na fração insolúvel em água, que possivelmente foi o suficiente para dificultar a hidrólise e consequentemente reduzir o rendimento da fermentação. O teor de etanol atingido no tratamento a 180 °C, aliado ao maior teor de glicose entre os tratamentos, fez com que a conversão em etanol a 180 °C fosse a menor encontrada.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES FINAIS

O acúmulo de amido em *Landoltia punctata* foi influenciado pela escassez de nutrientes. O máximo teor de amido foi de 32,5% (m m^{-1}) após 6 dias sob escassez de nutrientes.

A biomassa de lemna enriquecida em amido apresentou 12,9% (m m^{-1}) de celulose e 25,8% (m m^{-1}) de amido.

A liquefação do amido de lemna se mostrou um processo simples e brando. A agitação e a temperatura nas condições testadas não tiveram efeito sobre o processo, ocasionando uma economia pelo o uso de menores valores de agitação (50 rpm) e temperatura (65 °C). A eficiência da liquefação nas condições otimizadas foi de 60,5% em 3 horas.

A condição ótima considerada para a sacarificação do amido de lemna foi de pH 5,0; temperatura 45 °C e agitação 100 rpm. A eficiência da sacarificação foi de 99% em 8 horas. A enzima complementar para a hidrólise da celulose parece não ter efeito na eficiência da reação. A maior eficiência da sacarificação simultânea do amido e da celulose da biomassa de lemna sem pré-tratamento foi de 82% em 4 horas. As condições do processo foram pH 5,0, temperatura 45 °C, agitação 100 rpm, concentração de 1% (v m^{-1}) de amiloglucosidase, 0,3% (v m^{-1}) de pectinase e 20% (v m^{-1}) de celulase.

O pré-tratamento hidrotérmico se mostrou adequado para maximizar a conversão de etanol da fração celulósica da biomassa de lemna submetida à SFS. Na melhor condição (200 °C, 10 minutos, fator de severidade 3,9) a conversão em etanol foi 63% maior do que a encontrada na biomassa não tratada.

Para trabalhos futuros, sugere-se o desenvolvimento e aprofundamento do aprendizado desenvolvido nessa tese, como explicitado a seguir:

- ✓ Analisar o efeito do pré-tratamento na concentração de celulasas necessária para a SFS da biomassa de lemna;
- ✓ Realizar o pré-tratamento hidrotérmico na biomassa desprovida de amido;
- ✓ Realizar a SFS da fração amilácea previamente hidrolisada juntamente com a fração celulósica pré-tratada;
- ✓ Avaliar a viabilidade econômica do pré-tratamento hidrotérmico frente à redução da quantidade de celulasas e o aumento da conversão em etanol.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, S. G.; SCHULMAN, D.; LICHWA, J.; ANTAL JR.; LASER, M.; LYND, R. A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.40, p.2934-2941, 2001.
- ALMEIDA, A. C. S.; ARAÚJO, L. C.; ABREU, C. A. M.; LIMA, M. A. G. A.; PALHA, M. L. A. P. F. Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 8, p 55-62, 2008.
- ALMEIDA, C.; BRÁNYIK, T.; MORADAS-FERREIRA, P.; TEIXEIRA, J. Continuous production of pectinase by immobilized yeast cells on spent grains. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 21. 2005.
- ANDERSEN, N. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose - Experimental and Modeling Studies. BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Denmark, 2007.
- ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2012). Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Acessado em: 13/04/2014.
- AOAC. Official methods of analysis of AOAC International: food composition, additives, natural contaminants. Gaithersburg, 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. *Journal of Food Process Engineering*, v. 79, p. 950-955, 2007.
- BAI, F.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, v. 26, p. 89-105, 2008.

BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 34, p. 551-573, 2008.

BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, 2007.

BAUDEL, H. M. Pré-tratamento e hidrólise. III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise - Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol. São Paulo, 2006.

BELL J. L.; ATTFIELD, P. V. Breakthrough in yeast for making bioethanol from lignocellulosics. Sydney, NSW2109, Australia: Microbiogen Pty LTD, Macquarie University Campus; 2006.

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

BERTELLI, L. G. A Verdadeira História do Proalcool (2007). Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/proalcool/historia/proalcool-historia-verdadeira.htm>. Acesso em: 06/11/2012.

BETTIGA, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Comparing the xilose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology for Biofuels*, v. 1, n. 1, p. 16, 2008.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, v. 15, p. 583-620, 1997.

BNDES. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES, p. 316. 2008.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Introdução à química de Alimentos. São Paulo: Varela, 1995. cap 3. p. 12.

BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in Polymer Science*, v. 19, p. 797-841, 1994.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, Palo Alto, v. 54, p. 519-546, 2003.

BOISSET, C., FRASCHINI, C., SCHULEIN, M., HENRISSAT, B., CHANZY, H. Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Hemicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 1444-1452, 2000.

BOLWELL, P. G. Dynamic aspects of the plant extracellular matrix. *International Review of Cytology*, New York, v. 146, p. 261-324, 1993.

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

BOTHAST, R. J.; SCHLICHER, M. A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 67, n. 1, p. 19-25. 2005.

BOUDET, A.M. Towards an understanding of the supramolecular organization of the lignified wall. In: ROSE, J. (Ed.). *In the plant cell wall*. Oxford: Blackwell, 2003. p. 155-182.

BRANDT, A.; GRÄSVIK, J.; HALLETT, J. P.; WELTON, T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry*, v. 15, n. 3, p. 550-583, 2013.

BRISTOW, J. A., KOLSETH, P. Paper, structure and properties. M. Dekker, New York, 1986.

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

BRUGNAGO, N. Avaliação de lagoas de lemnas (*Landoltia punctata*) para o polimento de esgoto sanitário e fixação de gás carbônico. 2014. 134 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

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 Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1995.

CABRAL, J. M. S.; BARROS, M. R. A.; GAMA, M. Engenharia Enzimática. Lisboa: Lidel, 2003. p. 47-57.

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 Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.

CARA, C.; RUIZ, E.; OLIVA, J. M.; SÁEZ, F.; CASTRO, E. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, New York, v. 99, p. 1869-1876, 2008.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, Oxford, v. 3, p.1-30, 1993.

CARRILHO, F.; LIS, M. J.; COLOM, X.; VALLDEPERAS, M.; VALLDEPERAS, J. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic study. *Process Biochemistry*, London, v. 40, p. 3360-3364, 2005.

CASTRO, A. M.; PERREIRA, N. Jr. Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, n. 33, p. 181-188, 2010.

CHEN, Q.; JIN, Y. L.; ZHANG, G. H.; FANG, Y.; XIAO, Y.; ZHAO, H. Improving production of bioethanol from Duckweed (*Landoltia punctata*) by pectinase pretreatment. *Energies*, v. 5, p. 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*, v. 81, p. 81-85, 2002a.

CHENG, J. J.; LANDESMAN, L.; BERGMANN, B. A.; CLASSEN, J. J.; HOWARD, J. W.; YAMAMOTO, Y. Nutrient removal from swine

lagoon liquid by *Lemna minor* 8627. Transactions of the ASAE, v. 45, p. 1003-1010, 2002b.

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, v. 37, p. 17-26, 2009.

CIERESZKO, I.; BARBACHOWSKA, A. Sucrose metabolism in leaves and roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. Journal of Plant Physiology, v. 156, p. 640-644, 2000.

CINELLI, B. A. Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial. 2012. 183 f. Dissertação (mestrado em Engenharia Química). COPPE/ Programa de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

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. Biological Engineering, v. 3, p. 187-197, 2011.

CUI, W.; CHENG, J. J. Growing duckweed for biofuel production: a review. Plant Biology, v. 17 (Suppl. 1), p. 16-23, 2015.

CULLEY, D. D.; REJMANKOVA, E.; KOET, J.; PRYE, J. B. Production, chemical quality and use of duckweeds (*Lemnaceae*) in aquaculture, waste management, and animal feeds. Journal of the World Mariculture Society, v. 12, p. 27-49, 1981.

DA SILVA, R., FRANCO, C. M. L., GOMES, E. Pectinases, hemicelulasas e celulasas, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. Boletim da SBCTA, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.

DAVIES, G., HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. Structure, v. 3, p. 853-859, 1995.

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

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

DEMIRBAS, A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. Energy Conversion and Management, v. 49, n. 8, p. 2106-2116, 2008.

DIAZ, M. J.; CARA, C.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; MOYA, M.; CASTRO, E. Hydrothermal pretreatment of rapeseed straw. Bioresource Technology, v. 101, p. 2428-2435, 2010.

DIVNE, C., STAHLBERG, J., REINIKAINEN, T., RUOHONEN, L., PETTERSSON, G., KNOWLES, J. K. C., TEERI, T. T., JONES, T. A. The 3-dimensional crystal-structure of the catalytic core of cellobiohydrolase-I from *Trichoderma reesei*. Science, v. 265, p. 524-528, 1994.

ELLISTON, A.; COLLINS, S. R. A.; WILSON, D. R.; ROBERTS, I. N.; WALDRON, K. W. High concentrations of cellulosic ethanol achieved by fed batch semi simultaneous saccharification and fermentation of waste-paper. Bioresource Technology, v. 134, p. 117-126, 2013.

ELLISTON, A.; WILSON, D. R.; WELLNER, N.; COLLINS, S. R. A.; ROBERTS, I. N.; WALDRON, K. W. Effect of steam explosion on waste copier paper alone and in a mixed lignocellulosic substrate on saccharification and fermentation. Bioresource Technology, v. 187, p. 136-143, 2015b.

ELLISTON, A.; WOOD, I. P.; SOUCOURI, M. J.; TANTALE, R. J.; DICKS, J.; ROBERTS I. N.; WALDRON, K. W. Methodology for enabling high-throughput simultaneous saccharification and fermentation screening of yeast using solid biomass as a substrate. Biotechnology for Biofuels, v. 8, n. 2, p. 1-9, 2015a.

ERIKSSON, T.; KARLSSON, J.; TJERNELD, F. A. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrate with cellobiohydrolase I (Cel 7A) and endoglucanase I (Cel 7B) of *Trichoderma reesei*. Applied Biochemistry and Biotechnology, Clifford, v. 101, p. 41-60, 2002.

EYSTER, C. Nutrient concentration requirements for the *Chlorella sorokiniana*. The Ohio Journal of Science, v. 78, p. 79-81, 1978.

FARRELL, J. B. Duckweed uptake of phosphorus and five pharmaceuticals: microcosm and wastewater lagoon studies. Master's Thesis, Utah State University, Logan, UT, USA, 2012.

FENGEL, D., WEGENER, G. Wood chemistry ultrastructure reactions. Berlín: Walter de Gruyter, 1989. 610 p.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. Brazilian Journal Plant Physiology, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2007.

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.

FRY, S.C. The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. London: Longman Scientific and Technical, 1988. 246 p.

FUJITA, T.; NAKAO, E.; TAKEUCHI, M.; TANIMURA, A.; ANDO, A.; KISHINO, S.; KIKUKAWA, H.; SHIMA, J.; OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Characterization of starch-accumulating duckweeds, *Wolffia globosa*, as renewable carbon source for bioethanol production. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 6, p. 123-127, 2016.

GAIGHER, I. G.; PORATH, D.; GRANOTH, G. Evaluation of duckweed (*Lemna gibba*) as feed for tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) in a recirculating unit. *Aquaculture*, v. 41, p. 235-244, 1984.

GALBE, M.; ZACCHI, G. 2010. Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. In: Cortez (Ed.). *Bioetanol de cana-de-açúcar: PeD para produtividade sustentabilidade*. – São Paulo: Blucher, p. 697-716.

GAN, Q.; ALLEN, S. J.; TAYLOR, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. *Process Biochem.*, v. 38, p. 1003-1018, 2003.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *European Journal of Wood and Wood Products*, v. 57, p. 191-202, 1999.

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

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

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; NASTARI, P. M.; LUCON, O. Ethanol learning curve - the Brazilian experience. *Biomass and Bioenergy*, v. 26, n. 3, p. 301-304. 2004.

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 *Lemna gibba*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p. 317-323, 1995.

HASSAN, M. S. Cultivation of duckweeds *Lemna* and *Spirodela* as feed for Nile tilapia. M.Sc. Thesis. AIT Thesis No. AE-86-28. Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand, 109 p. 1986.

HASSAN, M. S.; EDWARDS, P. Evaluation of duckweed (*Lemna perpusilla* and *Spirodela polyrhiza*) as feed for Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v. 104, p. 315-326, 1992.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary-cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v. 40, p. 139-168, 1989.

HAYASHI, T.; MACLACHLAN, G. Pea xyloglucan and cellulose: I. Macromolecular organization. *Plant Physiology*, Lancaster, v. 75, n. 3, p. 596-604, 1984.

HAYASHI, T.; MARSDEN, M.; DELMER, D. P. Pea xyloglucan and cellulose. V. Xyloglucan-cellulose interaction *in vitro* and *in vivo*. *Plant Physiology*, Lancaster, v. 83, p. 384-389, 1987.

HENRISSAT, B.; TEERI, T. T.; WARREN, R. A. J. A scheme for designating enzymes that hydrolyze the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Letters*, v. 425, p. 352-354, 1998.

HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

HOLTZAPPLE, M. T. Hemicellulose. In: MACRAE R, ROBINSON R K, SADLER MJ, (Ed.). *Encyclopedia of Food Science, Food Technology And Nutrition*, London, v. 2. p. 2324-2334, 1993.

HON, D. N. S.; SHIRAIISHI, N. *Wood and cellulosic chemistry*. New York: Marcel Dekker, inc. 1032 p, 1991.

HSU, T. (1996). Pretreatment of biomass. In: *Handbook on bioethanol production and utilization*. Wyman C.F. (Ed.), Taylor & Francis, Bristol, p. 179-195.

HSU, T. A.; LADISCH, M. R.; TSAO, G. T. Alcohol from cellulose. *Chemical Technology*, v. 10, n. 5, p. 315-319, 1980.

HUANG, M.; FANG, Y.; XIAO, Y.; SUN, J.; JIN, Y.; TAO, X.; MA, X.; HE, K.; ZHAO, H. Proteomic analysis to investigate the high starch

accumulation of duckweed (*Landoltia punctata*) under nutrient starvation. *Industrial Crops and Products*, v. 59, p. 299-308, 2014.

IEA: International Energy Agency (2013). Bioenergy. Disponível em: <https://www.iea.org/topics/renewables/subtopics/bioenergy/>. Acessado em: 13/04/2014.

IEA: International Energy Agency (2016). Key World Energy Trends. Excerpt from: World energy balance. Disponível em: <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorldEnergyTrends.pdf>. Acessado em: 26/08/2016.

INGESSON, H.; ZACCHI, G.; YANG, B.; ESTEGHLALIAN, A. R.; SADDLER, J. N. The effect of shaking regime on thrate and extend of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Journal of Biotechnology*, v. 88, p. 177-182, 2001.

INMET: Instituto Nacional de Meteorologia. Estações automáticas – Gráficos (2014). Disponível em: http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf. Acessado em: 15/09/2016.

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

JACQUET, N.; QUIEVY, N.; VANDERGHEM, C.; JANAS, S.; BLECKER, C.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Influence of steam explosion on the thermal stability of cellulose fibres. *Polymer Degradation and Stability*, v. 96, n. 9, p. 1582-1588, 2011.

JAMBO, S. A.; ABDULLA, R.; AZHAR, S. H. M.; MARBAWI, H.; GANSAU, J. A.; RAVINDRA, P. A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Volume 65, November 2016, p. 756-769.

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

JARVIS, M. C.; FORSYTH, W. D.; HENRY, J. A survey of the pectic content of nonlignified monocot cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 88, n. 2, p. 309-314, 1988.

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

KABEL, M. A.; BOS, G.; ZEEVALKING, J.; VORAGEN, A. G. J.; SCHOLS, H. A. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresource Technology*, v.98, p. 2032-2042, 2007.

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. *Australian journal of animal Science*, v. 15, n. 4, p. 537-542, 2002.

KIM, S.; HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis corn stover. *Bioresource Technology*, New York, v. 96, p. 1994-2006, 2005.

KONDO, T. The relationship between intramolecular hydrogen bonds and certain physical properties of regioselectively substituted cellulose derivatives. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, v.35, p.717-723, 1997.

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

KOOTSTRA, A. M. J.; BEEFTINK, H. H.; SCOTT, E. L.; SANDERS, J. P. M. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for Biofuels*, v. 2, n. 31, 2009.

LANDOLT, E.; KANDELER, R. Biosystematics investigation in the family of duckweeds (Lemnaceae). The family of the Lemnaceae: a monographic study. Zurich: Veroff Geobot Inst ETH; v. 2. 1987.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL JR., M. J.; LYND, L. R. A comparison of liquid hot water and steam

pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology*, v. 81, p. 33-44, 2002.

LAWOKO, M.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Characterization of lignin carbohydrate complexes (LCCs) of spruce wood (*Picea abies* L) isolated with two methods. *Holzforschung*, Berlin, v. 60, p. 156-161, 2006.

LAWOKO, M.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Structural differences between the lignin-carbohydrate complexes presents in wood and chemical pulps. *Biomacromolecules*, Washington, DC, v. 6, p. 3467-3473, 2005.

LEE, D.; YU, A. H. C.; WONG, K. K. Y.; SADDLER, J. N. Evaluation of the enzymatic susceptibility of cellulosic substrates using specific hydrolysis rates and enzyme adsorption. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 45, n. 45, p. 407-415, 1994.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, v. 56, p. 1-24, 1997.

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

LEHNINGER, A. L; NELSON, D. L; COX, M. M. Princípios da bioquímica. 3° ed. São Paulo: SARVIER, 2002, p. 234-235.

LEMONS, J. L. S. (2001). Estudo da produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

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 (Série: Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas). São Paulo: Fundação Cargill, 2001. v. 4, cap. 22, p. 280-290.

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.

LES D. H., CRAWFORD, D. J. *Landoltia* (Lemnaceae), a New Genus of Duckweeds. *Journal for Botanical Nomenclature*, v. 9, n. 4, p. 530-533, 1999.

LIAO, W.; LIU, Y.; LIU, C.; WEN, Z.; CHEN, S. Acid hydrolysis of fibers from dairy manure. *Bioresource Technology*, New York, n 97, p. 1687-1695, 2006.

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

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

LIN, W. L.; FELDBERG, R. S.; CLARK, E. D. B. Kinetics of cell growth and heterologous glucoamylases production in recombinant *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology and Bioengineering*, Malden, v. 41, p. 273-279, 1993.

LOHMEIER-VOGER, E. M.; SOPHER, C. R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Amsterdam, v. 20, p. 75-81, 1998.

LU, X.; ZHANG, Y.; ANGELIDAKI, I. Optimization of H₂SO₄-catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: focusing on pretreatment at high solids content. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 3048-3053, 2009.

LYND, L. R.; ELANDER, R. T.; WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 57, p. 741-761, 1996.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. V.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66. n. 3, p. 506-577, 2002.

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.

MAES, C.; DELCOUR, J. A. Alkaline Hydrogen Peroxide Extraction of Wheat Bran Non-starch Polysaccharides. *Journal of Cereal Science*, London, v. 34, p. 29-35, 2001.

MAMMAN, A. S.; LEE, J. M.; KIM, Y. C.; HWANG, I. T.; PARK, N. J.; HWANG, Y. K.; CHANG, J. S.; HWANG, J. S. Furfural: Hemicellulose/xylose-derived biochemical. *Biofuel, Bioproducts & Biorefining*, v.2, p. 438-454, 2008.

MAPA. Anuário Estatístico da Agroenergia 2015. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Produção e Agroenergia. 2015.

MATHEW, A. K.; CHANEY, K.; CROOK, M.; HUMPHRIES, A. C. Alkaline pre-treatment of oilseed rape straw for bioethanol production: evaluation of glucose yield and pre-treatment energy consumption. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 6547-6553, 2011.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 84, p. 37-53, 2009.

McMILLAN, J. D.; NEWMAN, M. M.; TEMPLETON, D. W.; MOHAGHEGHI, A. Simultaneous saccharification and cofermentation of dilute-acid pretreated yellow poplar hardwood to ethanol using xylose-fermenting *Zymomonas mobilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77-79, p. 649-665, 1999.

MENEZES, T. J. B. Importância da sacarificação na produção de alimentos e energia. In: Furtado, J. S. Fermentações industriais e transformações microbianas. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1980. Cap. 1, p. 5-11.

MILANEZ, A. Y. et al. A produção de etanol pela integração do milho-safrinha às usinas de cana-de-açúcar: avaliação ambiental, econômica e sugestões de política. 2014. p. 147-208. Disponível em <http://www.bndes.gov.br/bibliotecadigital>. Acessado em: 05/02/2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrossalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, Washington, v.31, n.3, p. 426-428, 1959.

MOHEDANO, R. A. Uso de macrófitas lemnáceas (*Landoltiapunctata*) no polimento e valorização do efluente de suinocultura e na fixação de carbono. 2010. 270f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Santa Catarina.

MOHEDANO, R. A.; COSTA, R. H. R.; TAVARES, F. A.; BELLI Filho, P. High nutrient removal rate from swine wastes and protein biomass production by full-scale duckweed ponds. *Bioresource Technology*, v. 112, p. 98-104. 2012.

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.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Chemical analysis of *Pinus oocarpa* wood PARTE I – quantification of macromolecular components and volatile extractives. *Revista Árvore*, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

MOSIER, N. S.; HENDRICKSON, R.; DRESCHER, R.; et al. Principles and economics of pretreating cellulose in water for ethanol production. Paper 103, BIOT Division, 225th American Chemical Society Meeting, New Orleans, March, 2003a.

MOSIER, N. S.; HENDRICKSON, R.; WELCH, G.; et al. Corn fiber pretreatment scale-up and evaluation in an industrial corn to ethanol facility. Paper 6A-04, 25th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Breckenridge, CO, 2003b.

MOSIER, N. S.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R. Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 673-686, 2005.

MURADOV, N.; FIDALGO, B.; GUJAR, A. C.; T-RAISSI, A. Pyrolysis of fastgrowing aquatic biomass e Lemna minor (duckweed): characterization of pyrolysis products. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 21, p. 8424-8428, 2010.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARAES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 6, p. 817-830, 2010.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton, v.98, p. 49-58, 2002.

NOVOZYMES. Cellic® CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials (2010). Disponível em: <http://www.scienceplease.com/files/products/overviews/cellicctec2.pdf>. Acesso em: 08/03/2014.

NOVOZYMES. Pectinex® Ultra AFP (2012). Disponível em: <http://catalog.gusmerenterprises.com/Asset/PectinexUltraAFPPDS.pdf>. Acesso em: 08/03/2014.

NOVOZYMES. Spirizyme® Fuel – The industry standard for saccharifications (2012). Disponível em: <http://bioenergy.webkreation.dk/files/documents/SpirizymeFuelbenefish eet.pdf>. Acesso em: 08/03/2014.

NOVOZYMES. Termamyl® 2X (2007). Disponível em: http://www.lnf.com.br/downloads/termamyl_2x.pdf. Acesso em: 08/03/2014.

NRC, Nuclear Regulatory Commission (2000). Disponível em: <http://www.nrc.gov/>. Acessado em 13/04/2014.

NYKO, D.; VALENTE, M. S.; MILANEZ, A. Y.; TANAKA, A. K. R.; RODRIGUES, A. V. P. A evolução das tecnologias agrícolas do setor sucroenergético: estagnação passageira ou crise estrutural (2013). Biblioteca Digital BNDES. Disponível em:

https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/1503/1/A%20mar37_10_A%20evolu%C3%A7%C3%A3o%20das%20tecnologias%20agr%C3%ADcolas%20do%20setor_P.pdf. Acessado em: 05/02/2015.

OHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2503-2510, 2007.

OHGREN, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Optimization of steam pretreatment of SO₂ impregnated corn stover for fuel ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton, n.124, p. 1055-1067, 2005.

OLSSON, L.; SOERENSEN, H. R.; DAM, B. P.; CHRISTENSEN, H.; KROGH, K. M.; MEYER, A. S. Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 129-132, p. 117-129, 2006.

OVEREND, R. P.; CHORNET, E.; GASCOIGNE, J. A. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions for the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences Philos*, v. 321, p. 523-536, 1987.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, v. 1, p. 25-33, 2000.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 31, n. 2, p. 135-152, 2000a.

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

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

PEDERSEN, M.; MEYER, A. S. Lignocellulose pretreatment severity – relating pH to biomatrix opening. *New Biotechnology*, v. 27, p. 739-750, 2010.

PENG, J.; WANG B.; SONG Y.; YUAN P. Model N transformation and removal in a duckweed pond: model application. *Ecological Modelling*, v. 206, p. 294-300, 2007.

PEREIRA JR., N; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. (2008). *Tecnologia de Bioprocessos. Séries em Biotecnologia. Biblioteca Nacional: Rio de Janeiro*, v. I, 2008. 62p.

PEREIRA, E. M. O ouro negro: Petróleo e suas crises políticas, econômicas, sociais e ambientais na 2a metade do século XX. *Outros Tempos*, v.5. Dossiê Religião e Religiosidade, p.54 -72, 2008.

PERLACK, R. D.; WRIGHT, L.; TURHOLLOW, L. A.; GRAHAM, R. L.; STOKES, B.; ERBACH, D. C. Biomass feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-ton annual supply. Oak Ridge National Laboratory Report ORNL/TM-2005/66. Oak Ridge, TN: US Dept. of Energy, 2005.

PHILIPPIDIS, G. P.; SMITH, T. K. Limiting factors in the Simultaneous Saccharification and Fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 51/52, p. 117-124, 1995.

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

PRAKASH, O.; JAISWAL, N. Alpha-Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 160, n. 8, p. 2401-2414, 2010.

RABELO, S. C. *Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração / Sarita Cândida Rabelo*. Campinas, SP: [s.n.], 2010. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

- RABELO, S. C.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. Comparison between lime and alkaline hydrogen peroxide pretreatments of sugarcane bagasse for ethanol. *Applied Biochemistry Biotechnology*, Clifton, v. 144, p. 87-100, 2008.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, São Paulo, v. 26, p. 863-871, 2003.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biology of plants*. New York: Worth Publ., 2001. 791 p.
- REGODÓN, J. A.; PÉREZ, F.; VALDÉS, M. E.; MIGUEL, C.; RAMÍREZ, M.; A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiology*, v. 14, n. 3, p. 247-254, 1997.
- REID, M. S.; BIELESKI, R. L. Response of *Spirodela oligorrhiza* to phosphorus deficiency. *Plant Physiology*, v. 46, p. 609-613, 1970.
- RFA. US fuel ethanol industry biorefineries and capacity. Washington, DC: Renewable Fuels Association, <http://www.ethanolrfa.org/industry/locations/>. 2010. Acessado em 20/01/2014.
- ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; DA SILVA, V. F. N.; GOMEZ, E. O.; GONÇALVES, A. R. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. *Bioresource Technology*, v. 111, p. 447-452, 2012.
- ROEHR, M. *The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications*: WILEY-VCH Verlag GmbH. 2001.
- ROLAND, J. C.; REIS, D.; VIAN, B. Liquid crystal order and turbulence in the planar twist of the growing plant cell walls. *Tissue and Cell*, Siena, v. 24, n. 3, p. 335-345, 1992.
- ROUVINEN, J.; BERGFORS, T.; TEERI, T.; KNOWLES, J. K. C.; JONES, T. A. Threedimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science*, v. 249, p. 380-386, 1990.

SAEMAN, J. F.; MOORE, W. E.; MITCHELL, R. L.; MILLETT, M. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Tappi J.*, v. 37, n. 8, p. 336-343, 1954.

SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SAXENA, R. C.; ADHIKARI, D. K.; GOYAL, H. B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 13, p. 167-178, 2009.

SCHACHT, C.; ZETZL, C.; BRUNNER, G. From plant material to ethanol by means of supercritical fluid technology. *Journal of Supercritical Fluids*, v.46, p. 299-321, 2008.

SECEX. Desenvolvimento da Produção. Biocombustíveis. Álcool combustível. Estatísticas e anexos. 2011. Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/index.php?area=2>. Acesso em: 06/11/2012.

SEGEL, I. H. *Bioquímica, Teoria e Problemas*. Traduzido Grassiano, D. M. Rio de Janeiro: Livros técnico e científicos, 1979.

SELVENDRAN, R. R.; O'NEILL, M. A. Isolation and analysis of cell walls from plant material. In: Glick D, editor. *Methods of biochemical analysis*. London: Academic Press; 1987. p. 27.

SERRANO, P. O.; FRANCO, C. M. L. Annealing and enzymatic hydrolysis of cassava starch, *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 8, n. 3, p. 220-232, 2005.

SHIKIDA, P. F. A.; FINCO, A.; CARDOSO, B. F.; GALANTE, V. A.; RAHMEIER, D.; BENTIVOGLIO, D.; RASETTI M. A Comparison Between Ethanol and Biodiesel Production: The Brazilian and European Experiences. In Domingos Padula et al. (eds.), *Liquid Biofuels: Emergence, Development and Prospects*, Springer-Verlag, London 2014, p 25-53.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, v. 81, p. 219-231, 2003.

SJOSTROM, E. *Wood chemistry. Fundamentals and applications*. 2nd . ed, New York: Academic press, 1993. p. 109 - 133.

SODA, S.; OHCHI, T.; PIRADEE, J.; TAKAI, Y.; IKE, M. Duckweed biomass as a renewable biorefinery feedstock: Ethanol and succinate production from *Wolffia globosa*. *Biomass and Bioenergy*, v. 81, p. 364-368, 2015.

SODERSTROM, J.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Effect of washing on yield in one- and two-step steam pretreatment of softwood for production of ethanol. *Biotechnology Progress*, v. 20, p. 744-749, 2004.

SOLOMON, B. D.; BARNES, J. R.; HALVORSEN, K. E. Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. *Biomass and Bioenergy*, v. 31, n. 6, p. 416-425, 2007.

SREE, K. S.; APPENROTH, K. J. Increase of starch accumulation in the duckweed *Lemna minor* under abiotic stress. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*, Special edition, p. 11-14. 2014.

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

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

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, v. 10, n. 5, p. 367-375, 1996.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Paredes celulares: estruturas, biogênese e expansão. In: *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 15, p. 339-364.

TAO, X.; FANG, Y.; XIAO, Y.; JIN, Y. Comparative transcriptome analysis to investigate the high starch accumulation of duckweed (*Landoltia punctata*) under nutrient starvation. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, n. 72, p. 1-15, 2013.

TELES, C. C. Avaliação de lagoas de lemnas para o polimento de esgoto doméstico com foco na microbiota associada. 2016. 135 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

TERASHIMA, N.; FUKUSHIMA, K.; HE, L. F.; TAKABE, K. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D.; RALPH, J. (Ed.). *Forage cell wall structure and digestibility*. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 1993. p. 247-270.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Review: Starch Composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, v. 39, p. 151-165, 2004.

TEYMOURI, F.; LAUREANO-PEREZ, L.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology*, New York, n. 96, p. 2014-2018, 2005.

THORSTEINSSON, B.; TILLBERG, J. E. Carbohydrate partitioning, photosynthesis and growth in *Lemna gibba* G3. II. Effects of phosphorus limitation. *Physiologia Plantarum*, v. 71, p. 271-276, 1987.

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

UENOJO, M.; PASTORE, M. G. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

VAN SOEST, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2.ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476p.

VANDEPUTTE, G. E.; DELCOUR, J. A. From sucrose to starch granule to starch physical behavior: a focus on rice starch. *Carbohydrate Polymers*, v. 58, p. 245-266, 2004.

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. 12, p. 137-140, 2007.

VIALJAMAE, P.; KIPPER, K.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G. Synergistic cellulose hydrolysis can be described in terms of fractal-like kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v. 84, p. 254-257, 2003.

WALDRON, K. Bioalcohol production: biochemical conversion of lignocellulosic biomass. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd; 2010.

WHIMS, J. Corn Based Ethanol Costs and Margins (attachment 1), Agricultural Marketing Resource Center. Department of Agricultural Economics, Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA 2002.

WHITNEY, S. E. C.; BRIGHAM, J. E.; DARKE, A. H.; GRAND-REID, J. S.; GIDLEY, M. J. *In vitro* assembly of cellulose/xyloglucan networks: ultrastructural and molecular aspects. *The Plant Journal*, Oxford, v. 8, p. 491-504, 1995.

WHITNEY, S. E. C.; GOTHARD, M. G. E.; MITCHELL, J. T.; GIDLEY, M. J. Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. *Plant Physiology*, Lancaster, v. 121, p. 657-663, 1999.

WOOD, I. P.; COOK, N. M.; WILSON, D. R.; RYDEN, P.; ROBERTSON, J. A.; WALDRON, K. W. Ethanol from a biorefinery waste stream: Saccharification of amylase, protease and xylanase treated wheat bran. *Food Chemistry*, v. 198, p. 125-131, 2016.

WOOD, I. P.; ELLISTON, A.; COLLINS, S. R. A.; WILSON, D.; BANCROFT, I.; WALDRON, K. W. Steam explosion of oilseed rape straw: Establishing key determinants of saccharification efficiency *Bioresource Technology*, v. 162, p. 175-183, 2014.

WOOD, I. P.; WELLNER, N.; ELLISTON, A.; WILSON, D. R.; BANCROFT I.; WALDRON, K. W. Effect of Brassica napus cultivar on cellulosic ethanol yield. *Biotechnology for Biofuels*, v. 8, n. 99, p. 1-11, 2015.

WRIGHT, J. D.; WYMAN, C. E.; GROCHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose: Process evaluation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 17, p. 75-90, 1988.

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

XU, F.; SUN, J. X.; LIU, C. F.; SUN, R. C. Comparative study of alkali and acidic organic solventsoluble hemicellulosic polyssacharides from sugarcane bagasse. *Carbohydrates Research*, Amsterdam, n. 341, p. 253-261, 2006.

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

XU, J.; SHEN, G. Growing duckweed in swine wastewater for nutrient recovery and biomass production. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 2, p. 848-853, 2011.

YIN, Y.; YU, C.; YU, L.; ZHAO, J.; SUN, C.; MA, Y.; ZHOU, G. The influence of light intensity and photoperiod on duckweed biomass and starch accumulation for bioethanol production. *Bioresource Technology*, v. 187, p. 84-90, 2015.

YUAN, W. J.; CHANG, B. L.; REN, J. G.; LIU, J. P.; BAI, F. W.; LI, Y. Y. Consolidated bioprocessing strategy for ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Kluyveromyces marxianus* under high gravity conditions. *Journal of Applied Microbiology*, v. 112, p. 38-44, 2011.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuel, Bioproducts and Biorefining*, v. 2, p. 26-40, 2008.

ZHANG, J. J; SMITH, K. R. Household air pollution from coal and biomass fuels in China: measurements, health impacts, and interventions. *Environ Health Perspect*, v. 6, p. 848-855, 2007.

ZHAO, X.; ELLISTON, A.; COLLINS, S. R. A.; MOATES, G. K.; COLEMAN, M. J.; WALDRON, K. W. Enzymatic saccharification of

duckweed (*Lemna minor*) biomass without thermophysical pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, v. 47, p. 354-361, 2012.

ZHAO, X.; MOATES, G. K.; ELLISTON, A.; WILSON, D. R.; COLEMAN, M. J.; WALDRON, K. W. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded duckweed: Improvement of the ethanol yield by increasing yeast titre. *Bioresource Technology*, v. 194, p. 263-269, 2015a.

ZHAO, X.; MOATES, G. K.; WELLNER, N.; COLLINS, S. R. A.; COLEMAN, M. J.; WALDRON, K. W. Chemical characterisation and analysis of the cell wall polysaccharides of duckweed (*Lemna minor*). *Carbohydrate Polymers*, v. 111, p. 410-418, 2014.

ZHAO, X.; MOATES, G. K.; WILSON, D. R.; GHOGARE, R. J.; COLEMAN, M. J.; WALDRON, K. W. Steam explosion pretreatment and enzymatic saccharification of duckweed (*Lemna minor*) biomass. *Biomass and Bioenergy*, v. 72, p. 206-215, 2015b.

ZHU, J. Y.; VERRILL, S. P.; LIU, H.; HERIAN, V. L.; PAN, X. J.; ROCKWOOD, D. L. On polydispersity of plant biomass recalcitrance and its effects on pretreatment optimization for sugar production. *Bioenergy Resource*, v. 4, p. 201-210, 2011.

ANEXO 1 – ANÁLISE DE AMIDO

Neste anexo é apresentado o método de determinação de amido utilizando o 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 amiloglicosidade (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 caíam 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. Transferir 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 desolução padrão de D-glicose (1 mg mL^{-1}) 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;

162/180 = Ajuste de D-glicose livre para D-glicose anidro.

ANEXO 2 – QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA AR

As características de qualidade físico-química da água de rede de abastecimento em Florianópolis durante o mês de novembro de 2014 podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1. Características de qualidade físico-química da água de rede de abastecimento em Florianópolis durante o mês de novembro de 2014.

Parâmetros	Análises Portaria	Realizadas	Atenderam Portaria
Turbidez	161	178	158
Cor Aparente	51	178	118
Cloro Residual	161	179	178

Fonte: CASAN (2014).

Abaixo o significado dos parâmetros conforme portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde:

Turbidez: Indica presença de partículas em suspensão na água.

Cor aparente: Indica presença de substâncias dissolvidas que deterioram a qualidade estética da água.

Cloro residual: Agente químico utilizado para eliminar os microorganismos.

Análises portaria: Número mínimo de análises conforme Portaria em função do número de habitantes atendidos pelo sistema.

Realizadas: Número de análises realizadas.

Atenderam portaria: Número de análises que atenderam os valores permitidos pela Portaria.