



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS RAMAS DE
BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). PARA OBTENÇÃO DE
ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Deny Alves Macêdo

Orientador: Tarso da Costa Alvim

PALMAS – TO

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS RAMAS DE
BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). PARA OBTENÇÃO DE
ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Deny Alves Macêdo

Orientador: Tarso da Costa Alvim

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Tocantins como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Agroenergia.**

**PALMAS – TO
2017**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Palmas**

Macêdo, Deny Alves

Otimização da hidrólise enzimática das ramas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) para obtenção de etanol de segunda geração – Palmas, 2017. 71f.

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Tocantins, Mestrado em Agroenergia.

Linha de pesquisa: Processos de obtenção de biocombustíveis e avaliação de aproveitamento de seus resíduos. 2017.

Orientador: Prof. Dr. Tarso da Costa Alvim

1. 1. BIOETANOL. 2. ETANOL LIGNOCELULOSICO . 3. RAMAS DE BATATA-DOCE . 4. OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .

I. Alvim, Tarso da Costa. II. Universidade Federal do Tocantins. III. Título.

CDU 333.7

Bibliotecária: XXXXXX

CRB-2 / 1309

Todos os Direitos Reservados – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do código penal.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA

**OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE DAS RAMAS DE BATATA-DOCE
(*Ipomoea batatas* (L.) Lam). PARA OBTENÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA
GERAÇÃO**

ALUNO: DENY ALVES MACÊDO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Tarso da Costa Alvim (Presidente da comissão)

Prof^ª. Dr^ª. Daniele Seipel da Silva Lim Yan (Examinadora Externa)

Prof^ª. Dr^ª. Flávia Lucila Tonani de Siqueira

Data da Defesa: 14 /08 /2017.

“Fé não é acreditar que Deus pode, mas que Deus quer”. (Abraão Lincoln).

Dedico este trabalho ao meu querido Deus e minha família por todo o suporte incondicional, em especial ao meu pai, Antônio Santos Macêdo, a minha mãe Edivanda Alves Macêdo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pois sem a sua benção nada pode ser alcançado nesta vida, por ter me dado à oportunidade de estudar nesta universidade, trabalhar com as pessoas que trabalhei e crescer mental, profissional e espiritualmente durante este período.

“Agradeço a Deus, porque se tenho que me gloriar, glorio-me no Senhor, pois ELE cuida de mim!” “Hoje sei que vontade não é tudo, porém é essencial para alcançar qualquer objetivo.”

Ao meu orientador e vice-coordenador do programa de mestrado em Agroenergia Professor Tarso da Costa por todos os ensinamentos, muito obrigada mesmo!

A minha coordenadora Flávia Tonani pelo apoio e carinho!

Agradeço a minha família, meu Pai Antonio Santos Macêdo e minha mãe Edivanda Alves Macêdo os quais me deram não tudo que quis, mas tudo de que precisei para conquistar o que quis e chegar não ao topo, mas a um nível mais elevado desta montanha chamada sucesso. Aos meus irmãos Anderson, Vanderson, Suelane e Glaucia, pelo apoio. Pai, Mãe e irmãos obrigados pelo amor, pelo carinho, a minha imensa gratidão.

Grata a Pedro e Eugênia, por sempre estar na torcida, me tratando sempre como uma filha.

William, obrigada por todo apoio, carinho, ensinamentos e momentos vividos, pois ao longo dessa caminhada tenho aprendido muito com você.

Aos técnicos e colegas Gabriela, Kalyana, Ilsamar, Robson do laboratório da Universidade Federal do Tocantins do Complexo de Laboratórios do LABIC e LPPN, por toda paciência e ajuda durante os experimentos.

Aos meus colegas (Filipe, Layanni e Weder) do mestrado pela convivência agradável e debates construtivos.

Aos amigos que foram fundamentais para esta conquista, serei imensamente grata!”

A todas as pessoas que em ajudaram ao longo destes anos.

MACÊDO, D. A. Otimização da hidrólise enzimática das ramas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). para obtenção de etanol de segunda geração. Palmas, 2017. 79f. Dissertação (Mestrado em Agroenergia), Universidade Federal do Tocantins – UFT.

RESUMO

A biodegradação dos materiais lignocelulósicos tem sido objeto de muitos estudos e aplicada em processos tecnológicos. A tecnologia para converter biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis apresenta grande potencial sustentável para produção de etanol de segunda geração. A obtenção de etanol a partir de biomassa envolve três etapas: pré-tratamento, hidrólise e a fermentação. A hidrólise de celulose gera glicose e celobiose (um dímero de glicose) e a hidrólise de ligninas e hemicelulose gera açúcares e subprodutos (principalmente HMF, furfural e ácido acético), que muitas vezes inibem a fermentação microbiana. Este trabalho teve como objetivo otimizar a hidrólise enzimática da rama-de-batata para obtenção de etanol de segunda geração. Para desenvolvimento do experimento foi aplicado um planejamento composto central variando temperatura (30° C, 40°C e 50°C), tempo (24, 48 e 72 horas) e carga enzimática (30,120 e 210FPU). As variáveis de resposta foram as concentrações de monômeros (glicose, xilose e arabinose) e inibidores (ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural) no hidrolisado. As condições operacionais ótimas para a hidrólise foram definidas como temperatura de 30° C, tempo de processo de 72 horas, carga enzimática de 30FPU, nessas condições teríamos 11,97 g/L de glicose, 2,29g/L de xilose e 2,10g/L de ácido acético. Os efeitos dos fatores ocasionaram baixas concentrações de inibidores furfural e HMF não afetando o rendimento do processo.

Palavras chaves: *Ipomoea batatas*; hidrólise enzimática; etanol lignocelulósicos.

MACÊDO, D. A. Optimization of the enzymatic hydrolysis of sweet potato branches (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). To obtain second generation ethanol. Palmas, 2017. 79f. Dissertation (Master in Agroenergy), Federal University of Tocantins - UFT.

ABSTRACT

The biodegradation of lignocellulosic materials has been the object of many studies being applied in technological processes. The technology to convert lignocellulosic biomass into fermentable sugars presents great sustainable potential for the production of second generation ethanol. Obtaining ethanol from biomass involves two steps, first consisting of the hydrolysis of polysaccharides, generating mono and disaccharides, and later involves the fermentation of monomers and disaccharides in ethanol. Cellulose hydrolysis generates glucose and cellobiose (a glucose dimer). On the other hand, the hydrolysis of lignins and hemicellulose generates sugars and by-products (mainly HMF, furfural and acetic acid), which often inhibit microbial fermentation. This work aimed to optimize the enzymatic hydrolysis of the potato branch to obtain second generation ethanol. For the development of the experiment, a rotational central composite planning was performed, varying temperature (30 ° C, 40 ° C and 50 ° C), time (24, 48 and 72 hours) and enzymatic loading (30, 120 and 210FPU). Response variables were the concentrations of monomers (glucose, xylose and arabinose) and inhibitors (acetic acid, hydroxymethylfurfural and furfural) in the hydrolyzate. The optimal operating conditions for the experiment were defined as temperature of 30 ° C, process time of 72 hours, enzymatic loading of 30FPU, under these conditions we would have 11.97 g / L glucose, 2.29 g / L xylose. The effects of the factors caused low concentrations of furfural and HMF inhibitors without affecting the yield of the process.

Key words: *Ipomoea batatas*; Enzymatic hydrolysis; Lignocellulosic ethanol.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Referências de estudos encontrados na literatura de diversas formas de tratamento enzimático | 27 |
| Tabela 2 - Padrões de carboidratos | 35 |
| Tabela 3 - Padrões de inibidores | 36 |
| Tabela 4 - Enzima cellic cetec2 | 38 |
| Tabela 5 - Variáveis do planejamento composto central..... | 39 |
| Tabela 6 - Composição da caracterização química da rama de batata-doce | 41 |
| Tabela 7 - Combinações das variáveis tempo, carga e temperatura para obtenção dos açúcares fermentescíveis celobiose, glicose e xilose e do inibidor ácido acético..... | 43 |
| Tabela 8 - Análise de variância para a variável celobiose..... | 47 |
| Tabela 9 - Análise de variância para a variável glicose | 50 |
| Tabela 10 - Análise de variância para a variável xilose..... | 54 |
| Tabela 11 - Análise de variância para a variável ácida acética..... | 58 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura molecular do 5-Hidroximetilfurfural (C ₆ H ₆ O ₃). | 30 |
| Figura 2a, 2b e 2C - Biomassa de batata-doce seca em estufa (a) e triturada em moinho de facas (b) e armazenados em fracos de vidro (c)..... | 31 |
| Figura 3 - Fluxograma do procedimento experimental | 32 |
| Figura 4 - Pré-tratamento das ramas de batata-doce com ácido diluído | 37 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1- Efeito do tempo, carga e da temperatura da hidrólise enzimática. . | 46 |
| Gráfico 2- Superfície de resposta para avaliação da celobiose em função da temperatura e carga enzimática | 48 |
| GRÁFICO 3 - Efeito do tempo, carga e da temperatura..... | 49 |
| Gráfico 4- Efeito do tempo, carga e da temperatura da hidrólise enzimática | 49 |
| Gráfico 5 - Superfície de resposta para avaliação da glicose em função do tempo e da carga enzimática | 51 |
| Gráfico 6 - Efeito do tempo, carga e da temperatura da hidrólise enzimática. | 53 |
| Gráfico 7 - Superfície de resposta da xilose em função do tempo e temperatura..... | 54 |
| Gráfico 8- Superfície de resposta da xilose em função da temperatura e da carga enzimática | 55 |
| Gráfico 9- Superfície de resposta da xilose em função do tempo e da carga enzimática | 55 |
| Gráfico 10 - Efeito do tempo, carga e da temperatura da hidrólise enzimática. | 56 |
| Gráfico 11- Valores observados x valores preditos | 57 |
| Gráfico 12- Superfície de resposta do ácido acético em função do tempo da carga enzimática | 58 |

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

ANP: Agência Nacional do Petróleo

ANOVA: Análise de Variância

BDI: Batata-doce industrial

CBHI: glicose

CBHII: celobiose

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DCC: Delineamento Composto Central

EG ou EC: endoglicanases

EtOH: Etanol

ex: exemplo

FPU: unidade papel filtro

HMF: hidroximetilfurfural

IEA: INTERNATIONAL ENERGY AGENCY

LASPER: Laboratório de sistemas de produção de energia a partir de fontes renováveis

°C: Graus Celsius

pH: potencial hidrogeniônico

R²: Coeficiente de determinação

rpm: Rotação por minuto

SHF: fermentação separada

SSF: fermentação simultânea

T: temperatura

T: tempo

UFT: Universidade Federal do Tocantins

UV: ultra violeta

α: alfa

β: beta

SUMÁRIO

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. | OBJETIVOS..... | 16 |
| 2.1. | Objetivo geral | 16 |
| 2.2. | Objetivos específicos | 17 |
| 3. | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 17 |
| 3.1. | Biocombustíveis | 18 |
| 3.1.1. | Bioetanol..... | 18 |
| 3.1.2. | Etanol de fontes diretamente fermentescíveis | 19 |
| 3.1.3. | A Batata-doce | 21 |
| 3.1.4. | As Ramas da Batata-doce x Etanol lignocelulósico..... | 22 |
| 3.2. | Composição química de materiais lignocelulósicos..... | 23 |
| 3.3. | Hidrólise Enzimática do material lignocelulósico | 24 |
| 3.3.1. | Fatores que interferem na hidrólise enzimática | 28 |
| 3.4. | Inibidores e seus efeitos | 29 |
| 4. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 30 |
| 4.1. | Local do experimento e obtenção da rama-de-batata para produção de etanol lignocelulósicos | 30 |
| 4.2. | Fluxograma Experimental | 31 |
| 4.3. | Determinações analíticas..... | 32 |
| 4.3.1. | Determinações do conteúdo de cinzas..... | 33 |
| 4.3.2. | Caracterização química da Rama-de-batata | 33 |
| 4.3.3. | Lignina Solúvel..... | 33 |
| 4.3.4. | Carboidratos e ácido acético | 34 |
| 4.3.5. | Hidroximetilfurfural (HMF) e Furfural..... | 35 |
| 4.3.6. | Quantificação das frações de polissacarídeos (celulose, hemicelulose e lignina) na rama de batata-doce | 36 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.3.7. | Pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído | 37 |
| 4.3.8. | Sacarificação enzimática | 38 |
| 4.3.9. | Otimização da hidrólise enzimática | 38 |
| 4.3.10. | Análise estatística dos resultados | 40 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 41 |
| 5.1. | Caracterização da matéria-prima | 41 |
| 5.2. | DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA 42 | |
| 5.3. | Análise estatística | 45 |
| 5.4. | Modelagem da variável celobiose | 45 |
| 5.6. | Modelagem da variável xilose | 52 |
| 5.8. | Inibidores Hidroximetilfurfural e Furfural..... | 59 |
| 6. | CONCLUSÕES..... | 61 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 62 |

1. INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis são produzidos a partir de biomassas de fontes renováveis, produtos vegetais ou composto animal, classificados conforme a matéria prima e a tecnologia empregada. Eles são identificados como primeira, segunda e terceira geração. Os biocombustíveis de primeira geração são aqueles produzidos pela fermentação de amidos e/ou de açúcares. Os de segunda geração vêm ganhando crescente interesse nos anos recentes como uma possível alternativa mais verde do que os combustíveis fósseis. São produzidos por pré-tratamento e fermentação, utilizando materiais lignocelulósicos, tais como resíduos agrícolas, florestais e industriais. Os de terceira geração são produzidos por fermentação de amido algáceos.

Visando a obtenção de açúcares fermentescíveis a partir de materiais lignocelulósicos torna-se fundamental a realização de um pré-tratamento, pois, por exemplo, a hidrólise enzimática de materiais sem um pré-tratamento resulta em rendimentos inferiores a 20% do valor teórico. Além disso, o processo de hidrólise enzimática é considerado lento e pouco econômico, por isso, a eficácia na etapa de pré-tratamento fundamental para melhorar o processo (TSAO, 1978; CARA et al., 2006; SAAD, 2010).

No entanto, estes pré-tratamentos além de formarem açúcares derivados da hidrólise e da degradação da celulose e hemicelulose, formam, também, compostos que podem atuar como inibidores na fermentação. A natureza e concentração destes compostos dependem do tipo de biomassa pré-tratada, assim como das condições do processo (Caetano e Madaleno, 2011). Estes compostos derivados do furano se comportam como inibidores dos microrganismos, danificando as paredes e membranas celulares, inibindo o crescimento celular, reduzindo as atividades enzimáticas e conseqüentemente a produção de etanol (Olea et al., 2012).

A busca por pesquisa que buscam o aperfeiçoamento no processo de obtenção de etanol de segunda geração é de grande relevância, e o presente trabalho tem como objetivo estabelecer condições ideais para a hidrólise enzimática das ramas da batata-doce visando maior liberação de açúcares fermentescíveis, para produção de bioetanol.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Otimizar a hidrólise enzimática das ramas de batata-doce (*ipomoea batatas* (L.) lam). para obtenção de etanol de segunda geração

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a composição química da rama de batata-doce.

Otimizar o processo de hidrólise enzimática da rama da batata-doce para a produção de açúcares fermentescíveis na linha de processo de etanol.

Avaliar a influência das variáveis operacionais (temperatura, tempo e carga enzimática) sobre as variáveis dependentes (rendimento mássico de açúcares e eficiência da hidrólise).

Quantificar os açúcares fermentescíveis e os inibidores provenientes da hidrólise (celbiose, glicose, xilose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural).

3.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Biocombustíveis

Biocombustível é definido pela Lei 9.478/97, como substância derivada de biomassa renovável, tal como, biodiesel, etanol e outras substâncias estabelecidas em regulamento da ANP, que pode ser empregada diretamente ou mediante alterações em motores a combustão interna ou para outro tipo de geração de energia, podendo substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil. Os biocombustíveis são biodegradáveis, por isso provocam menor impacto à natureza e essas fontes são renováveis podendo se recompor num ritmo capaz de suportar sua utilização sem restrições ou risco de esgotamento (NETO e LEAL, 2012).

Rodrigues (2011) relata que os biocombustíveis são identificados como de primeira e de segunda geração. Os de primeira geração são aqueles produzidos a partir de matérias-primas usadas também como alimentos, para humanos e animais. Em decorrência, estes biocombustíveis geram questionamentos éticos, políticos e ambientais. Para contornar estas inquietações, a produção de biocombustíveis de segunda geração (isto é, gerados a partir de resíduos, rejeitos ou de produtos não comestíveis), vem ganhando crescente interesse nos anos recentes como uma possível alternativa mais verde do que os combustíveis fósseis.

A Agência Internacional de Energia distingue biocombustíveis tradicionais domésticos – ex: lenha, esterco animal e óleos vegetais - de biocombustíveis industriais, os quais se dividem como de primeira geração – ex: etanol de cana-de-açúcar e biodiesel – e de segunda geração – ex: etanol lignocelulósico (IEA, 2004; SCHULZ, 2010).

Os biocombustíveis apresentam as seguintes vantagens: (a) podem ser facilmente obtidos a partir de fontes de biomassa abundantes e baratas; (b) seu uso permite reduzir a emissão de carbono para a atmosfera (GARCIA, 2012); (c) eles são biodegradáveis e contribuem para a sustentabilidade (PUPPAN, 2002; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

3.1.1. Bioetanol

O etanol (C_2H_5OH ou EtOH) é o biocombustível mais utilizado em veículos, podendo ser usado diretamente como combustível ou misturado à gasolina, elevando seu conteúdo de oxigênio e conseqüentemente permitindo uma maior combustão da mesma, além de diminuir a emissão de gases poluentes (DERMIBAS, 2005).

Segundo Leal e Leite (2007), etanol pode ser obtido de diferentes matérias-primas que contenham açúcares ou polímeros de açúcares, como cereais, frutas, tubérculos, gramíneas como a cana-de-açúcar, sorgo sacarino etc. Essas matérias-primas podem ser divididas, quanto ao insumo básico em:

a) Açúcares - cana-de-açúcar, melão, sorgo sacarino, frutas, beterraba. Os açúcares são convertidos diretamente em etanol via fermentação, após o processo de extração;

b) Amidos - grãos como o milho, trigo, cevada, arroz, tubérculos como mandioca, batata, batata-doce. Os amidos são convertidos em açúcares via fermentação, após sacarificação, hidrólise e esses açúcares são posteriormente fermentados;

c) Lignocelulósicos - resíduos agro-florestais, gramíneas como o capim-elefante, resíduos orgânicos do lixo urbano e florestas plantadas. A celulose e a hemicelulose precisam ser convertidas em açúcares via hidrólise para posterior fermentação.

O bioetanol é obtido a partir da biomassa por duas rotas de conversão principais: fermentação do açúcar/amido e fermentação da biomassa lignocelulósica. Algumas biomassas não apresentam a necessidade de serem hidrolisadas (fontes sacarinas), no entanto outras necessitam ter os monossacarídeos disponibilizados antes de serem fermentados, por exemplo, as biomassas amiláceas e lignocelulósicas (IEA, 2011; ALVIM, 2014).

3.1.2. Etanol de fontes diretamente fermentescíveis

Menezes (1980) e Camacho (2013) relata que matérias-primas ricas em carboidratos podem ser agrupadas em duas categorias, as diretamente fermentescíveis que não necessitam de conversão prévia do carboidrato, e as

indiretamente fermentescíveis que precisam sofrer essa conversão prévia antes da fermentação, de modo a torná-lo assimilável pela levedura alcoólica.

Dentre as matérias-primas diretamente fermentescíveis o autor destaca a cana-de-açúcar, beterraba, sorgo sacarino (colmo) e polpas de frutas apresentando os sacarídeos do tipo sacarose, glicose e frutose. Qualquer produto que contenha uma quantidade considerável de carboidratos (açúcares) constitui-se em matéria-prima para obtenção de álcool pela via fermentativa. Entretanto, para que seja viável economicamente, é preciso que se considere o seu volume de produção, rendimento industrial e o custo de fabricação.

Embora no Brasil o uso de cana açúcar para produção de álcool seja muito bem sucedido, outras matérias-primas podem ser consideradas, bem seja para possibilitar a produção em regiões sem vocação agrícola de alguma cultura ou pelo aproveitamento das perdas resultantes da produção agrícola existente, tanto na colheita como na classificação final (FILHO, 2003).

O Tocantins, já conhecido nacionalmente pela produção de grãos e criação de gado, também vem crescendo no setor de agroenergia. Em 2011, foi inaugurada a primeira usina para produção de açúcar e bioenergia do Estado, a Bunge, em Pedro Afonso. Segundo o subsecretário de Energias Limpas da Secretaria da Agricultura, da Pecuária e do Desenvolvimento Agrário, Ailton Parente Araújo, o Tocantins tem capacidade para implantar 24 usinas de etanol e a expectativa é que outras empresas nacionais e multinacionais reconheçam essa grande possibilidade de investimento no Estado. Para os próximos anos, a projeção é que seja cultivado 1,2 milhão de hectares com a cana-de-açúcar. Outro ponto positivo para a produção de cana-de-açúcar no Tocantins, é que tudo que já é produzido na região respeita os preceitos ambientais e trabalhistas. “A Bunge não queima a palhada da cana, conseqüentemente não degrada o meio ambiente. Além disso, todo o corte da planta é mecanizado, não tendo nenhuma associação com trabalho análogo à escravidão. Usinas novas facilitam esse investimento inicial”, explicou Araújo (REIS et. al, 2014).

Portanto, o investimento na produção de cana-de-açúcar no Tocantins está se dando nos moldes nacionais, com tecnologia adequada ao solo, clima e outras variáveis, bem como com tecnologia inovadora e que, no futuro, tenderá a aumentar a produtividade do Estado e sua participação no cenário de produção de biocombustíveis e bioenergia em nível nacional (ABREU E

NASCIMENTO, 2016).

3.1.3. A Batata-doce

A produção brasileira de batata-doce ocupa o sexto lugar entre as hortaliças mais plantadas no Brasil, correspondendo a uma produção anual estimada em 500.000 toneladas, obtida em uma área de aproximadamente 48.000 hectares. Embora a produção tenha apresentado redução, percebe-se que o índice de produtividade tem sido crescente nos últimos anos, de modo que o sistema de produção tem sofrido mudanças que indicam uma evolução do nível tecnológico (EMBRAPA-2016).

A batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam) é originária das Américas Central e do Sul, sendo encontrada desde a Península de Yucatan, no México, até a Colômbia. Relatos de seu uso remontam de mais de dez mil anos, com base em análise de batatas secas encontradas em cavernas localizadas no Vale de Chilca Canyon, no Peru, e em evidências contidas em escritos arqueológicos encontradas na região ocupada pelos Maias, na América Central (SILVA, 2004).

Desde os anos 70 muitos pesquisadores já buscavam desenvolver combustível de batata-doce, em média, uma tonelada de batata doce rende até 180 litros de álcool e 300 quilos de resíduo, utilizado para produção de farinha e de ração animal. O álcool de batata-doce é um produto de alto valor agregado destinado à fabricação de bebidas, cosméticos, tintas e remédios, utilizados em vários países como a Bélgica e o Japão (CAMACHO, 2013). A produção de etanol a partir da batata-doce tem sido alvo de pesquisas e discussões. Em Mato Grosso, o tema foi discutido durante o „Fórum Nacional de Batata-Doce Industrial para produção de Etanol e Derivados“ (BioTGA, 2012).

No Estado do Tocantins o cultivo da batata-doce pode ocorrer durante o ano todo, desde que se utilize irrigação. A temperatura mínima de 22°C e máxima de 45°C, associada às precipitações média de 1500 mm.anuais, se mostram altamente favoráveis para obtenção de elevadas produtividades. DUDA é uma cultivar de película externa roxa e polpa branca, de formato irregular, alongado, redondo e muito desuniforme. Apresenta resistência aos

insetos de solo. É uma cultivar tardia, sendo que a colheita deve ser realizada 180 dias após o plantio, para um melhor aproveitamento da indústria. A produtividade média obtida, nos últimos cinco anos, foi de 65,5 t/ha, em ciclo de 6 meses, podendo ser colhida também com 7 meses. O teor de matéria seca é de 40,4%, podendo conferir neste caso rendimentos de 161,04 litros de etanol por tonelada de raiz. Em função de sua elevada produtividade esta cultivar é considerada a mais produtiva para indústria, nas condições do Tocantins, por combinar em um único genótipo elevado teor de matéria seca e produtividade o que resulta em produções de 10467 litros de etanol por hectare (SILVEIRA, 2008).

3.1.4. As Ramas da Batata-doce x Etanol lignocelulósico

A batata-doce apresenta a característica de armazenar reservas nutritivas em suas raízes como amido, proteína, fibras, cinzas e lipídeos, possuindo assim um imenso potencial industrial para a produção de biocombustíveis. Podemos complementar que a batata-doce é uma das culturas mais eficientes, quando se trata de aproveitar a energia solar e convertê-la em energia química (MONTES et al.2006).

Partes das ramas com boa sanidade são usadas na produção da cultura, pois para a implantação de uma lavoura de batata-doce, o produtor tem três opções para obter novas plantas: brotação de batatas selecionadas, utilização de ramas-semente de uma cultura em desenvolvimento ou aquisição de mudas de um viveiro (MASIERO, 2012). No plantio convencional usam-se as ramas-sementes (estacas da planta) retiradas das partes mais novas do caule contendo seis a oito entrenós (cerca de 30 cm), pois nesta região as chances são maiores de enraizamento rápido, além de apresentarem um menor índice de contaminação por fungos, pragas e outros patógenos (SILVEIRA et al., 2014).

Outro gargalo é a subutilização das ramas, que podem ser aproveitadas como co-produto agregando valor a cadeia produtiva do etanol de batata-doce. Sabe-se que a biomassa da parte aérea (ramas e folhas) possui em sua composição altos teores de proteína e carboidratos complexos, aliado a uma produtividade média de 20 toneladas por hectares. Podendo ter múltiplas aplicações como na fabricação de rações para animais, alimentação humana e

produção de etanol de 2º geração.

Barbosa (2016), aperfeiçoou a técnica de superfície de resposta otimizando as condições de pré-tratamento com ácido diluído da rama da batata-doce aplicando um planejamento que variou a temperatura (60° C a 120°C), tempo (30 a 90 minutos), carga de sólidos (2 a 10%,) e concentração de ácido sulfúrico (1 a 5%). As condições operacionais ótimas para o pré-tratamento do experimento foram definidas como temperatura de 105° C, tempo de processo de 75 minutos, carga de sólidos de 8%, e concentração de ácido de 4%, nessas condições o pesquisador obteve 12,63g/L de glicose, 5,01g/L de xilose, 3,63g/L de arabinose, 0,17g/L.

Segundo Ferreira-Leitão et al. (2010), o aproveitamento de resíduos agroindustriais e florestais destaca-se na produção de combustíveis renováveis, produtos químicos e de energia, uma vez que sua disponibilidade acaba por solucionar o problema do acúmulo.

Já Paes (2010) afirma que o processo de produção do etanol de segunda geração é composto por duas etapas: primeiramente, quebram-se as longas cadeias de celulose e hemicelulose, via hidrólise enzimática ou química, com a finalidade de obter açúcares de moléculas menores e, em seguida, os açúcares reduzidos, obtidos no processo de hidrólise são fermentados, assim como ocorre com a sacarose da cana-de-açúcar.

No processo de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, a lignina atua como uma barreira física para as enzimas que podem ser irreversivelmente capturadas pela lignina e, conseqüentemente, influenciar na quantidade de enzima requerida para a hidrólise, assim como dificultar a recuperação da enzima após a hidrólise (LU et al., 2002; SANTOS et al., 2012).

Devido à íntima associação recalcitrante existente entre os três componentes poliméricos da biomassa, a liberação dos polissacarídeos como fonte de açúcares fermentescíveis para produção de etanol está entre as mais importantes e urgentes prioridades nas áreas de pesquisa e desenvolvimento do etanol celulósico (ZHANG, 2008; SANTOS et al., 2012).

3.2. Composição química de materiais lignocelulósicos

Material celulósico é um termo genérico para descrever os constituintes

principais na maioria dos vegetais, ou seja, a celulose, a hemicelulose e a lignina, cuja composição depende não apenas do tipo de vegetal, mas também de condições de crescimento, da parte da planta escolhida, da idade de colheita, etc. (Barl et al.,1991; Wiselogel et al., 1996; Brown, 1999; Ogeda e Petri, 2010).

Os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose (cerca de 70% da massa seca), entremeados por outra macromolécula, formados por álcoois aromáticos, a lignina, aos quais se encontram unidos por ligações covalentes e de hidrogênio (LEE, 1997 apud SILVA, 2010).

A fração celulósica (40%-60% da matéria seca) é um polímero linear do dímero glicose-glicose (celobiose), rígido e difícil de ser quebrado. Sua hidrólise gera glicose, um açúcar de seis carbonos, cuja fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* já é bem conhecida. Por sua vez, a fração hemicelulósica (20-40%), em geral, é constituída de uma cadeia principal de xilose (ligações β -1,4) (BNDES, 2008).

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula mais abundante dentre as biomassas lignocelulósicas. É um heteropolímero amorfo que consiste em três diferentes unidades de fenilpropanos: álcool p-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico. A estrutura da lignina não é homogênea, possui regiões amorfas e estruturas globulares. A composição e a organização dos constituintes da lignina variam de uma espécie para outra, dependendo da matriz de celulose-hemicelulose (FENGEL e WEGENER, 1989; SANTOS et al., 2012).

3.3. Hidrólise Enzimática do material lignocelulósico

O processo de conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis para a produção de etanol celulósico envolve quatro etapas: (I) pré-tratamento, para romper a estrutura cristalina da celulose (II) hidrólise enzimática, para hidrolisar os polissacarídeos em açúcares fermentescíveis; (III) fermentação, para converter os açúcares em etanol e a (IV) destilação, que visa à separação de componentes de uma mistura, de acordo com a

volatilidade relativa dos componentes (SANTOS; COLODETTE; QUEIROZ, 2013). O principal objetivo do pré-tratamento é solubilizar ou separar um ou mais componentes da biomassa fazendo com que o sólido resultante seja mais acessível para um tratamento adicional quer seja esse químico ou biológico (SARKAR et al., 2012). Sem o pré-tratamento a hidrólise biológica da celulose na sua forma natural, não só consumiria grande quantidade de enzimas, como também diminuiria o rendimento do processo (HAGHIGHI MOOD et al., 2013).

Devido à natureza recalcitrante da biomassa, a hidrólise enzimática é muito lenta e é difícil atingir elevados rendimentos em açúcar se a biomassa não for previamente pré-tratada. O pré-tratamento é provavelmente a etapa crucial, uma vez que tem forte impacto em todas as outras etapas do processo, por exemplo, na hidrólise enzimática e na fermentação, em termos de digestibilidade da celulose e toxicidade da fermentação (GALBE; ZACCHI, 2002).

Um pré-tratamento ideal deve ter características como: aumentar a fração celulose amorfa que é mais sensível ao ataque enzimático; evitar a formação de inibidores para a hidrólise enzimática e a fermentação; ter baixa demanda energética; ter baixo custo para produção de reatores de pré-tratamento; produzir poucos resíduos; usar poucos reagentes ou reagentes de baixo valor (BALAT, 2011; GALBE; ZACCHI, 2012).

Após o pré-tratamento, a biomassa é sacarificada pela ação de enzimas (celulases) altamente específicas que reduzem os complexos carboidratos em açúcares evitando a degradação da glicose (BALAT, 2011). A hidrólise enzimática é preferida à hidrólise ácida, porque requer menos energia, não apresenta problemas de corrosão e é conduzida em condições brandas (pH: 4,8 e T: 45-50°C) (SUN e CHENG, 2002; SARKAR et al., 2012). Almeida (2009) define a hidrólise enzimática como sendo uma reação química, em meio aquoso, para a quebra de uma molécula em frações menores catalisada por enzimas.

As celulases são uma mistura de enzimas, onde pelo menos três grupos principais estão envolvidos na hidrólise: (1) Endoglicanases (EG, endo-1,4- β -D-glicanases, ou EC 3.2.1.4), que quebram aleatoriamente sítios internos e amorfos (ou de baixa cristalinidade) da cadeia polissacarídica da celulose, gerando oligossacarídeos de vários comprimentos e, portanto, novos extremos

de cadeia. (2) Exoglicanases ou celobiohidrolases (CBHI, exo-1,4- β -D-glicosidase, EC. 3.2.1.74 conhecidas como celudextrinases e as CBHII, exo-1,4- β -D-glicanases, EC. 3.2.1.91), que atuam sobre as extremidades redutoras e não redutoras, da cadeia de polissacarídeos de celulose, liberando tanto glicose (CBHI) quanto celobiose (CBHII) como produtos principais. Estas enzimas sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (glicose e celobiose). (3) β -glicosidases (BG, celobiasas ou EC. 3.2.1.21), que hidrolisam as celudextrinas solúveis e a celobiose em glicose (LYND et al., 2002), e também sofrem inibição pelo produto da hidrólise (LEE e FAN, 1983).

Um gargalo importante na conversão de biomassa em etanol é o custo da hidrólise enzimática da biomassa. Embora a hidrólise enzimática tenha várias vantagens em relação à hidrólise ácida (tal como a redução do impacto ambiental e a diminuição da formação de produtos com efeito negativo sobre a fermentação), os custos e a eficiência deste processo, ou seja, a determinação das melhores condições ainda requer melhoria (OKAMOTO et al., 2011).

Na Tabela 1 estão resumidas algumas condições de otimização da hidrólise enzimática utilizadas na produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassas de composição lignocelulósica.

Tabela 1 - Referências de estudos encontrados na literatura de diversas formas de tratamento enzimático.

| OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA | | | | | | | |
|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------|-------|--|------------------------|---------------------|
| Autor e ano | Matéria prima | Condições da hidrólise enzimática | | | | | |
| | | pH | T°C | T (h) | Carga enzimática | Agitação do meio (rpm) | Carga de sólidos(%) |
| Mendes et. al.(2012) | Capim mandarú | 5 – 5,5 | 45 – 50 | 72 | 30 FPU | 200 | 10 |
| Di Cai et al., (2016) | Espiga de milho | 7 | 50 | 2 | 30celulase(FPU/g) | 200 | 10 |
| Linde et al., (2006) | Palha de cevada | - | - | 20 | 20celulase(FPU/g) e 25 de β -glucosidase (UI/g) | - | 10 |
| Martin et al., (2002) | Bagaço-da-cana | - | - | 8 | 8,3 celulase (FPU/g) e 7,8 de β -glucosidase (UI/g) | - | 5 |
| Ping Li et al., (2016) | Haste do milho | 4,7 | 50 | 2 | 15 celulase(FPU/g) | 150 | 10 |
| Santos et al., (2014) | Palha da cana-de-açúcar | 4,8 | 50 | 2 | 15 celulase(FPU/g) | 150 | - |
| Santos, (2014) | Sabugo de milho | 4,8 | 50 | 2 | - | 150 | 1 |
| Ferreira et al., (2009) | Cistus ladanifer e Cytisus striatus | \pm 4-6,5 | \pm 30– 55 | 4-120 | \pm 1-50 celulase (FPU/g) e \pm 1-300 β -glucosidase(UI/g) | 100 – 250 | 1 |
| Zhang et al., (2009) | Sabugo de milho | - | - | 8 | 8 celulase (FPU/g) | | 12,50 |
| ZHU et al., (2010) | Cavaco de Pinus | 5,8 | 50 | - | 15celulase (FPU/g) e 22,5 de β -glucosidase (UI/g) | 200 | 8 |

A hidrólise enzimática consiste no uso de enzimas capazes de converter o polímero de celulose, presente na fração celulósica, em unidades fermentáveis de glicose. Esse processo é realizado por celulasas (endoglucanase e exoglucanase), que quebram a celulose em celobiose, que, por fim, são convertidas em duas moléculas de glicose pela β -glucosidase. Esse processo apresenta especificidade da reação, ausência de reações secundárias, ausência de formação de produtos secundários (inibidores da fermentação alcoólica) e reação em condições que não requerem altas pressões e temperaturas, ou ambientes corrosivos para os equipamentos (BASTOS, 2007).

3.3.1. Fatores que interferem na hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática é uma das rotas utilizadas para aumentar a eficiência do pré-tratamento. Enzimas tais como celulasas, sintetizadas por fungos e bactéria, trabalham em conjunto para degradar a celulose e outros polissacarídeos estruturais na biomassa. Muitos fatores podem afetar a hidrólise enzimática da celulose, como por exemplo, a concentração de substrato, a atividade da celulase e as condições da reação (temperatura, pH, bem como outros parâmetros). Para melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise, é necessário otimizar o processo e reforçar a atividade das celulasas (SUN; CHENG, 2002).

Os fatores que afetam a hidrólise enzimática da celulose incluem o substrato, a atividade da celulase e condições de reação (temperatura, pH, bem como outros parâmetros). A susceptibilidade dos substratos celulolíticos dependentes das características estruturais do substrato incluindo a cristalinidade da celulose, grau de polimerização da celulose, a área de superfície e conteúdo de lignina. A lignina interfere na hidrólise, bloqueando o acesso das celulasas a celulose e pela ligação irreversível das enzimas hidrolíticas. Portanto, a remoção da lignina pode dramaticamente aumentar a taxa da hidrólise (BORTOLAZZO, 2011; McMILLIAN, 1994).

Essa etapa é considerada de grande potencialidade, uma vez que proporciona maiores rendimentos, é realizada sob pressão ambiente e temperaturas moderadas, (50-60°C), não forma subprodutos indesejáveis e

ainda possibilita a utilização de técnicas avançadas de biotecnologia para sua otimização. No entanto, ainda enfrenta vários gargalos tecnológicos. O principal deles é o elevado custo das enzimas utilizadas no processo (RODRIGUES, 2009).

A relação entre fatores estruturais reflete a complexidade da recalcitrância da biomassa lignocelulósica. A variabilidade dessas características explica o grau de digestibilidade enzimática entre diferentes fontes de biomassa (SANTOS et al., 2012; ZHENG et al., 2009).

Subhedar e Gogate (2013); Kim et al., (2011), relatam que outra limitação no uso de celulase é que há uma redução nas taxas devido à inibição do produto final (Celobiose e glicose). Os inibidores solúveis formados durante o processamento de lignocelulose também atua como uma barreira. Estes inibidores incluem açúcares solúveis, ácidos orgânicos, furanos, e compostos fenólicos. Esses inibidores causam a desativação da celulase, reduzindo a taxa e o rendimento da hidrólise de celulose.

3.4. Inibidores e seus efeitos

O sucesso da fermentação de hidrolisados lenhocelulósicos depende do equilíbrio entre a formação de compostos inibitórios e a capacidade de desintoxicação, (in vivo), das células de levedura. Assim sendo, é fundamental perceber o efeito dos compostos inibitórios na fisiologia das células, devendo, para tal, utilizar-se estratégias de controle da fermentação que não comprometam o rendimento do processo (Lopes da Silva et al., 2012).

Um dos inibidores da fermentação alcoólica que se forma a partir da degradação de hexoses (monossacáridos como a manose, a galactose e a glucose), provenientes de hemicelulose e celulose, durante o pré-tratamento e hidrólise da biomassa lenhocelulósica é um aldeído furano designado 5-hidroximetilfurfural. Da sua estrutura molecular fazem parte um anel furano, um grupo funcional aldeído e um álcool conforme a figura 1 e o seu aparecimento.

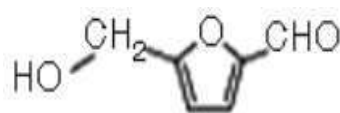


Figura 1 - Estrutura molecular do 5-Hidroximetilfurfural (C₆H₆O₃).

(Fonte: Almeida et al., 2007)

tem sido associado ao processamento térmico. Alguns estudos já realizados demonstram o efeito inibidor do HMF sobre o crescimento celular de *C. beijerinckii* P260 em experiências realizadas com hidrolisado de palha de trigo (Qureshi et al., 2011). Outro estudo relata o efeito do furfural, HMF e ácido acético em estirpes microbianas indígenas isoladas para produção de bioetanol (Wikandari et al., 2010).

Barbosa (2016) utilizando a rama de batata-de-doce observou que nas mais severas condições experimentais testadas é possível obter a total solubilização das arabinanas e bom rendimento de glicose e xilose, não ocorrendo formação excessiva de inibidores.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Local do experimento e obtenção da rama-de-batata para produção de etanol lignocelulósicos

Neste experimento foram utilizadas ramas de batata-doce industrial, cultivar Duda, catalogada como BDI-112. Os procedimentos foram realizados no LABIC – Laboratório de Instrumentalização científica.

A cultivar selecionada para a produção de etanol lignocelulósicos foi cedida pelo Laboratório de Sistemas de Produção de Energia a partir de Fontes Renováveis (LASPER), localizado na Estação Experimental/UFT, na cidade de Palmas, TO, coletadas no mês de junho de 2016.

Duda se destaca das demais cultivares devido à sua produtividade de 65,5 t/ha, um teor de matéria seca de 40,4(v/v) o que pode gerar um rendimento de até 161,04 litros de etanol, por tonelada de raiz, o que resulta sendo a mais produtiva para indústria, nas condições do Tocantins. Esta

apresenta como características, uma película externa roxa, polpa branca, formato irregular, alongado, redondo e muito desuniforme, apresentando também uma resistência a insetos do solo.

Esse material, após seco em estufa com circulação de ar a 60°C, por 48 horas, foi moído em passado em peneira de 30 mesh, separado em frascos de vidro hermeticamente fechados e armazenados para realização do pré-tratamento (Figura 2a, 2b e 2c).



Figura 2a, 2b e 2C - Biomassa de batata-doce seca em estufa (a) e triturada em moinho de facas (b) e armazenados em frascos de vidro (c)

Fonte: Do autor (2017).

4.2. Fluxograma Experimental

Neste trabalho foi aplicado o pré-tratamento com ácido diluído da rama-de-batata conforme Barbosa (2016). Após essa etapa, as amostras foram submetidas à hidrólise enzimática sob diversas condições operacionais. A figura 3 sintetiza, em um fluxograma, todas as etapas envolvidas na parte experimental do trabalho sendo descrito a seguir.

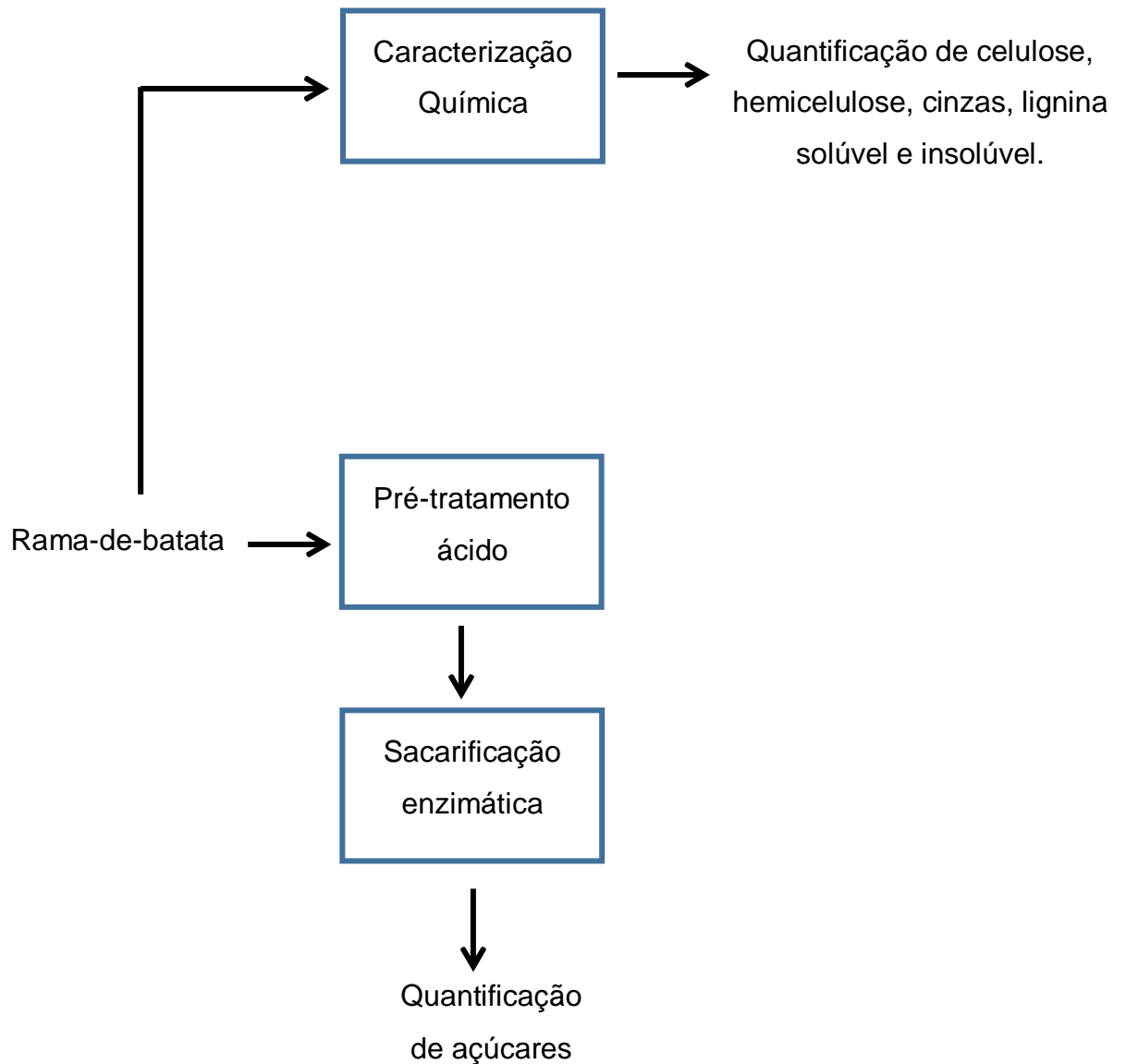


Figura 3- Fluxograma do procedimento experimental

Fonte: Do autor (2017).

4.3. Determinações analíticas

As determinações do teor de cinzas, lignina solúvel e insolúvel, açúcares e inibidores, na matéria-prima e no hidrolisado foram feitas em duplicatas, utilizando a metodologia descrita por Barbosa (2016), adaptada por SLUITER et al. (2008).

4.3.1. Determinações do conteúdo de cinzas

Para determinação de cinzas foi pesado 1g da biomassa, em cadinho de porcelana, previamente calcinado em balança analítica previamente zerada. A amostra foi aquecida em forno mufla a 300°C, por uma hora, e posteriormente a temperatura foi elevada para 550°C, durante 3 horas. Após este período o cadinho foi resfriado em dessecador e, em seguida, foi pesado para realizar-se o cálculo do conteúdo de cinzas na biomassa, por diferença de pesagens.

4.3.2. Caracterização química da Rama-de-batata

A caracterização da rama foi feita por meio de uma hidrólise em duas etapas. Primeiramente, foram pesados 0,3g da rama-de-batata e adicionado 3 mL de ácido sulfúrico, à 72%(v/v), em um tubo de ensaio. Os tubos foram aquecidos a 30°C, por 1 hora, sendo que a cada 10 minutos foram homogeneizados. Terminadas as reações, foram resfriados em banho gelado. Em seguida, o conteúdo do tubo foi transferido para um frasco de vidro e aquecido em autoclave, a 120°C, por uma hora. Após a hidrólise o conteúdo do frasco foi filtrado em papel filtro qualitativo, e a balança previamente zerada quando uma alíquota do filtrado foi retirada para análise de carboidratos, inibidores e lignina solúvel. O resíduo que permaneceu no filtro foi neutralizado com lavagens sucessivas, usando-se 3 litros de água deionizada e, depois de neutralizado, o filtro foi seco em estufa a 105°C, e posteriormente pesado e na balança analítica. O conteúdo de lignina insolúvel foi calculado pela diferença entre o peso do resíduo insolúvel que permaneceu no papel filtro e o conteúdo de cinzas da biomassa.

4.3.3. Lignina Solúvel

Para a obtenção do teor de lignina solúvel foi recolhida uma amostra de 100 µl do hidrolisado do licor, colocada em um balão volumétrico de 50 ml, completando-se o volume com água deionizada. Em seguida fez-se a medição do teor de lignina no comprimento de onda de 280 nm, em um

espectrofotômetro UV-visível (HACH modelo DR 5000). A porcentagem de lignina foi calculada conforme a sequencia das equações 1, 2, 3.

$$C_{\text{lignina solúvel}} = ((41,87 \times (A_T - A_{PD}) - 0,3279) \times 10^{-3}) \quad \text{Equação (1)}$$

$$A_{PD} = C_1 \epsilon_1 + C_2 \epsilon_2 \quad \text{Equação (2)}$$

$$\% \text{ lignina solúvel} = \frac{(C_{\text{lignina solúvel}} \times V_{\text{filtrado}} \times FD)}{M_1} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

- A_T é a absorbância de lignina junto com os produtos de degradação, a 280 nm;
- A_{PD} é a absorbância, a 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), calculado por meio da equação 2, cujas concentrações C_1 e C_2 foram determinadas via CLAE, e ϵ_1 e ϵ_2 são as absorvidades de furfural e HMF (146,85 e 114 g/L respectivamente);
- $C_{\text{lignina solúvel}}$ é a concentração de lignina solúvel obtida por meio da equação 1, em g/L;
- V_{filtrado} é o volume do hidrolisado filtrado;
- FD é o fator de diluição para leitura de absorbância;
- M_1 é a massa (g) das ramas utilizadas na caracterização, descontando-se o teor de umidade.

4.3.4. Carboidratos e ácido acético

A análise cromatográfica dos carboidratos e do ácido acético foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Shimadzu (LC-

10Series Avp desgaseificador DGU-14A, integrador CLASS LC-10), com eluição isocrática, pelo bombeamento (LC-10AD) de uma fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico, em água ultrapura (destilada e deionizada). O fluxo do eluente foi de 0,6 mL/min, a 30°C (forno de coluna CTO-10A), com corrida de tempo total de 20 minutos. A detecção se deu em detector de índice de refração (Shimadzu, modeloRID-10A). Uma alíquota de 20,0 µl da amostra foi injetada manualmente (injetor Rheodyne - iL malha 20) e permeada por uma coluna Phenomenex Rezex ROA-OrganicAcid H+ (300 x 7,8 mm), com conexão direta a cartucho de segurança Phenomenex Carbo-H (4 x 3 mm), preenchido com material semelhante ao da coluna principal.

A Tabela 2 mostra a relação dos padrões para construção da curva de calibração, que gerou uma equação utilizada para calcular as concentrações.

Tabela 2 - Padrões de carboidratos

| Padrões | Fabricante | Pureza |
|----------------------|-------------------|---------------|
| Arabinose | Sigma-Aldrich | ≥ 99% |
| Celobiose | Sigma-Aldrich | ≥ 98% |
| Glicose | Sigma-Aldrich | ≥ 99% |
| Xilose | Sigma-Aldrich | ≥ 99% |
| Ácido acético | Sigma-Aldrich | ≥ 87% |

4.3.5. Hidroximetilfurfural (HMF) e Furfural

A determinação do HMF e do furfural foi realizada utilizando-se coluna Phenomenex Luna C18 5µ (2) (250 x 4,6 mm) e pré-coluna Phenomenex C18 (4 x 3,0 mm) preenchida com material semelhante ao da coluna principal. O fluxo do eluente foi de 1mL/min, a 30°C, com corrida de tempo total de 15 minutos. A eluição foi isocrática com uma solução de acetonitrila/água (1:8 com 1% de ácido acético) o detector foi UV (SPD-10A) com comprimento de onda a 276 nm. As concentrações destes compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão conforme a Tabela 3.

Tabela 3- Padrões de inibidores

| Padrões | Fabricante | Pureza |
|----------|---------------|--------|
| HMF | Sigma-Aldrich | ≥ 99% |
| Furfural | Sigma-Aldrich | ≥ 98% |

4.3.6. Quantificação das frações de polissacarídeos (celulose, hemicelulose e lignina) na rama de batata-doce

Para a realização do cálculo do conteúdo de polissacarídeos na matéria-prima foram utilizadas as concentrações de monômeros e de inibidores provenientes da determinação em CLAE e da determinação de lignina solúvel e insolúvel conforme equações 4, 5, e 6:

$$C_{\text{celulose}} = 0,95 \cdot C_{\text{Celobiose}} + 0,90 \cdot C_{\text{glicose}} + 1,29 \cdot C_{\text{HMF}} \quad \text{Equação (4)}$$

$$C_{\text{Hemicelulose}} = 0,88 \cdot C_{\text{xilose}} + 0,88 \cdot C_{\text{Arabinose}} + 1,38 \cdot C_{\text{Furfural}} + 0,70 \cdot C_{\text{Ác.Acético}} \quad \text{Equação (5)}$$

$$C_{\text{lignina}} = C_{\text{lignina solúvel}} + C_{\text{lignina insolúvel}} \quad \text{Equação (6)}$$

Onde:

- C_{celulose} é a concentração de celulose em (g/L);
- $C_{\text{celobiose}}$ é a concentração de celobiose em (g/L);
- C_{glicose} é a concentração de glicose em (g/L);
- C_{HMF} é a concentração de hidroximetilfurfural em (g/L);
- $C_{\text{hemicelulose}}$ é a concentração de hemicelulose em (g/L);
- C_{xilose} é a concentração de xilose em (g/L);

- $C_{\text{Arabinose}}$ é a concentração de arabinose em (g/L);
- C_{Furfural} é a concentração de furfural em (g/L);
- C_{lignina} é a concentração de lignina em (g/L);
- $C_{\text{lignina solúvel}}$ é a concentração de lignina solúvel em (g/L);
- $C_{\text{lignina insolúvel}}$ é a concentração de lignina insolúvel em (g/L);

4.3.7. Pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído

Para o processo de pré-tratamento, pesou-se 3g e verificou-se a umidade de cada frasco de vidro hermeticamente fechado em balança de umidade e, através da carga de sólidos 8% (m/m), obteve-se a massa desejada a ser pesada e o volume da solução ácida a ser utilizado.

As ramas trituradas conforme item 4.1 foram então submetidas ao pré-tratamento químico com ácido sulfúrico 4% (v/v) realizado em frascos de vidro de 250 mL, aquecidos em estufa a 105°C, por 75 minutos, e depois resfriados em banho gelado (4°C) para finalização da reação (figura 4).



Figura 4 - Pré-tratamento das ramas de batata-doce com ácido diluído.

Fonte: Do autor (2017).

Após o término da reação, as amostras hidrolisadas foram lavadas com água destilada (temperatura ambiente) e a hidrolisada foi fracionada em peneiras com malha nº 450. As frações líquidas (licor) foram armazenadas em

frascos âmbar e refrigeradas a 4°C até realização das análises. A parte sólida foi lavada com água destilada e posta para secagem em estufa a 105°C, por 24 horas.

4.3.8. Sacarificação enzimática

As preparações enzimáticas empregadas para sacarificação dos substratos foram diluídas (na proporção de 1:10, em base seca), em uma solução de tampão 0,1M, pH 5. Durante o experimento foram avaliados os efeitos da temperatura, tempo e carga enzimática. Em seguida, as amostras foram incubadas e colocadas em banho-maria a 100°C inativando as enzimas. As amostras foram então centrifugadas, e em seguida retirado o sobrenadante para determinação de açúcares (glicose, xilose, arabinose, furfural e HMF) por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para a realização dos experimentos de hidrólise enzimática, utilizou-se o complexo enzimático comercial Cellic Cetec2 (Novozymes), cedida pelo LAPEQ - Laboratório de Pesquisa em Química Ambiental e de Biocombustíveis da UFT. A tabela a seguir demonstra a melhor estabilidade operacional de acordo com o catálogo do fabricante.

Tabela 4 - Enzima cellic cetec2

| ESTABILIDADE OPERACIONAL DA ENZIMA | |
|---|--|
| COMPOSIÇÃO | celulases, β -glicosidase e hemicelulase |
| TEMPERATURA (°C) | 45 a 50 |
| pH | 5 a 5,5 |

4.3.9. Otimização da hidrólise enzimática

A otimização da hidrólise enzimática dos substratos foi realizada de acordo com o delineamento experimental do tipo composto central, desenvolvido a partir de um planejamento envolvendo três variáveis, em dois níveis, e duas repetições no ponto central. Nesse experimento foram avaliados os efeitos da temperatura, da carga enzimática e do tempo. O delineamento completo é demonstrado na Tabela 5.

As respostas usadas para o experimento foram as concentrações de glicose, xilose, arabinose, furfural e HMF no hidrolisado.

Tabela 5 - Variáveis do planejamento composto central.

| ENSAIO | TEMPO(h) | CARGA ENZIMÁTICA(μL) | TEMPERATURA(C°) |
|---------------|-----------------|-----------------------------|------------------------|
| 1 | 24 | 20 | 30 |
| 2 | 24 | 20 | 50 |
| 3 | 24 | 120 | 30 |
| 4 | 24 | 120 | 50 |
| 5 | 72 | 20 | 30 |
| 6 | 72 | 20 | 50 |
| 7 | 72 | 120 | 30 |
| 8 | 72 | 120 | 50 |
| 9 | 48 | 30 | 40 |
| 10 | 24 | 30 | 40 |
| 11 | 72 | 30 | 40 |
| 12 | 48 | 20 | 40 |
| 13 | 48 | 120 | 40 |
| 14 | 48 | 30 | 30 |
| 15 | 48 | 30 | 50 |
| 16 | 48 | 30 | 40 |
| 17 | 24 | 20 | 30 |
| 18 | 24 | 20 | 50 |
| 19 | 24 | 120 | 30 |
| 20 | 24 | 120 | 50 |
| 21 | 72 | 20 | 30 |
| 22 | 72 | 20 | 50 |
| 23 | 72 | 120 | 30 |
| 24 | 72 | 120 | 50 |
| 25 | 48 | 30 | 40 |
| 26 | 24 | 30 | 40 |
| 27 | 72 | 30 | 40 |

| | | | |
|----|----|-----|----|
| 28 | 48 | 20 | 40 |
| 29 | 48 | 120 | 40 |
| 30 | 48 | 30 | 30 |
| 31 | 48 | 30 | 50 |
| 32 | 48 | 30 | 40 |

4.3.10. Análise estatística dos resultados

A análise estatística do planejamento experimental completo – DCC (Delineamento Composto Central), da hidrólise enzimática, foi realizada com dados experimentais e utilizando-se o software *Statistica® v.12.0*, onde foram investigadas as seguintes variáveis: temperatura, tempo e carga enzimática. Para essa análise, foram avaliadas as respostas: concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e HMF.

Foi determinada uma condição de hidrólise enzimática que possibilitasse as seguintes características desejáveis: alta liberação de glicose e baixa concentração de compostos inibidores. Com este propósito, um planejamento experimental completo foi realizado investigando-se as seguintes variáveis: tempo, carga enzimática e temperatura. Nas preparações enzimáticas foram avaliados os efeitos das variáveis de acordo com referências de estudos encontrados na literatura como mostrado na Tabela 1.

O efeito da aplicação de diferentes tempos, carga enzimática e temperaturas da hidrólise enzimática foi estudado por meio de um planejamento composto central (DCC) de faces centradas, contendo 2 níveis e 3 fatores, com 2 repetições nos pontos centrais. As faixas de variação entre o limite inferior e o superior de cada variável independente, foram estabelecidas de acordo com os dados mais comumente utilizados pelos autores referenciados na Tabela 1.

4.3.11. Estimativa da produção de etanol

Segundo Finguerut e colaboradores (1985), a estimativa do rendimento de processo fermentativo se deu de forma estequiométrica pela aplicação da equação de Gay – Lussac que, para efeito de cálculo, considera que cada 100

Kg de Açúcar Redutor Total (expressos em glicose) fermentado, produzem-se 51,1 Kg de etanol.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da matéria-prima

A Tabela 6 apresenta os resultados da composição química da biomassa empregada no presente trabalho, comparados a outros tipos de biomassa.

Tabela 6 - Composição da caracterização química da rama de batata-doce.

| BIOMASSA REFERÊNCIA | CELULOSE (%) | HEMICELULOSE (%) | LIGNINA (%) | CINZAS (%) | EXTRATIVOS (%) |
|--|---------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|
| Rama Batata-doce | 48,29 | 18,74 | 27,1 | 4,77 | 1,1 |
| Rama Batata-doce (BARBOSA, 2016) | 46,48 | 19,28 | 19,16 | 6,88 | 8,22 |
| Cana-de-açúcar (FUENTES et al., 2011.) | 37,4 | 23,7 | 25,1 | | |
| Palha de milho (YI et al., 2013) | 46,1 | 18,8 | 17,3 | | |
| Palha de arroz (HSU et al., 2010) | 36,6 | 16,1 | 13 | | |
| Palha de Trigo (KRISTENSEN et al., 2007) | 34,8 | 25,2 | 17,7 | | |

Os resultados mostram que a variedade de rama de batata-doce analisada apresentou 48,29% de celulose, 18,74% de hemicelulose, 27,10% de lignina total, 4,77% cinzas e 1,1% extrativos.

O alto teor de celulose comparado com os dados citados na literatura, por exemplo, com o bagaço da cana-de-açúcar, palha de milho, palha do arroz, palha do trigo (Fuentes et al., 2011; Yi et al., 2013; Hsu et al., 2010 e Kristensen et al., 2007), indica que esse material apresenta grande potencial

para conversão enzimática, consistindo numa boa opção para utilização na produção de etanol de segunda geração. Os resultados obtidos, comparados com os do trabalho descrito por Barbosa (2016), que utilizou essa mesma biomassa, demonstraram que os valores encontrados para celulose, hemicelulose, lignina e cinzas foram respectivamente: 46,40%, 19,28%, 19,16% e 6,88%, e estão equivalente.

5.2. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A Tabela 7 mostra os valores obtidos após hidrólise enzimática das ramas da batata-doce, para os monossacarídeos glicose, xilose, arabinose e para o inibidor ácido acético.

Tabela 7 - Combinações das variáveis tempo, carga e temperatura para obtenção dos açúcares fermentescíveis celobiose, glicose e xilose e do inibidor ácido acético.

| ENSAIO | TEMPO (h) | CARGA ENZIMÁTICA (FPU) | TEMPERATURA (°C) | CELOBIOSE (g/L) | GLICOSE (g/L) | XILOSE (g/L) | ACIDO ACÉTICO (g/L) |
|--------|-----------|------------------------|------------------|-----------------|---------------|--------------|---------------------|
| 1 | 24 | 210 | 30 | 3,58 | 0,13 | 0,22 | 1,38 |
| 2 | 24 | 210 | 50 | 0,7 | 4,14 | 0,63 | 1,44 |
| 3 | 24 | 30 | 30 | 3,58 | 7,84 | 1,34 | 1,47 |
| 4 | 24 | 30 | 50 | 4,1 | 9,16 | 0,47 | 1,71 |
| 5 | 72 | 210 | 30 | 1,19 | 6,69 | 1,09 | 1,39 |
| 6 | 72 | 210 | 50 | 0,52 | 3,04 | 0,47 | 1,52 |
| 7 | 72 | 30 | 30 | 3,31 | 8,82 | 1,89 | 1,64 |
| 8 | 72 | 30 | 50 | 4,2 | 8,41 | 1,22 | 1,67 |
| 9 | 48 | 120 | 40 | 0,98 | 5,56 | 0,95 | 1,4 |
| 10 | 24 | 120 | 40 | 1,23 | 6,03 | 0,95 | 1,35 |
| 11 | 72 | 120 | 40 | 0,96 | 5,89 | 0,99 | 1,46 |
| 12 | 48 | 210 | 40 | 0,87 | 6,27 | 0,91 | 1,43 |
| 13 | 48 | 30 | 40 | 4,04 | 7,81 | 1,22 | 1,47 |
| 14 | 48 | 120 | 30 | 1,06 | 5,98 | 0,97 | 1,44 |
| 15 | 48 | 120 | 50 | 0,78 | 5,4 | 0,84 | 1,51 |
| 16 | 48 | 120 | 40 | 1,02 | 6,56 | 1,01 | 1,41 |
| 17 | 24 | 210 | 30 | 1,11 | 4,93 | 0,88 | 1,49 |
| 18 | 24 | 210 | 50 | 0,74 | 5,18 | 0,69 | 1,39 |
| 19 | 24 | 30 | 30 | 0,57 | 6,9 | 1,48 | 1,45 |
| 20 | 24 | 30 | 50 | 2,18 | 7,19 | 1,34 | 1,45 |
| 21 | 72 | 210 | 30 | 1,15 | 6,88 | 1,13 | 1,52 |
| 22 | 72 | 210 | 50 | 0,67 | 5,81 | 0,8 | 1,45 |

*itens referenciados fazem alusão aos ótimos rendimentos obtidos nas condições parametrizadas

Continuação da tabela 7: Combinações das variáveis tempo, carga e temperatura para obtenção dos açúcares fermentescíveis celobiose, glicose e xilose e do inibidor ácido acético.

| ENSAIO | TEMPO (h) | CARGA ENZIMÁTICA (FPU) | TEMPERATURA (°C) | CELOBIOSE (g/L) | GLICOSE (g/L) | XILOSE (g/L) | ACIDO ACÉTICO (g/L) |
|--------|-----------|------------------------|------------------|-----------------|---------------|--------------|---------------------|
| 23 | 72 | 30 | 30 | 3,63 | 11,97 | 2,29 | 2,1 |
| 24 | 72 | 30 | 50 | 2,89 | 7,63 | 1,17 | 1,44 |
| 25 | 48 | 120 | 40 | 1,01 | 5,77 | 0,95 | 1,37 |
| 26 | 24 | 120 | 40 | 1,21 | 7,09 | 1,04 | 1,42 |
| 27 | 72 | 120 | 40 | 1,2 | 7,35 | 1,29 | 1,45 |
| 28 | 48 | 210 | 40 | 0,89 | 7,49 | 1 | 1,55 |
| 29 | 48 | 30 | 40 | 2,06 | 8,15 | 1,56 | 1,53 |
| 30 | 48 | 120 | 30 | 1,2 | 6,61 | 1,05 | 1,49 |
| 31 | 48 | 120 | 50 | 1,01 | 6,73 | 1 | 1,51 |
| 32 | 48 | 120 | 40 | 0,92 | 7,06 | 1,03 | 1,44 |

*itens referenciados fazem alusão aos ótimos rendimentos obtidos nas condições parametrizadas

Observando os dados, pode-se verificar que os maiores valores de rendimento foram: ensaio 8 celobiose (4,20g/L), ensaio 23 glicose (11,97g/L) e ensaio 23 xilose (2,29 g/L), isso se dando quando os tratamentos aplicados foram de 72h, 30FPU, 30 °C; 72h, 30FPU, 30°C e 72h, 30FPU, 30°C, respectivamente. É importante ressaltar que os rendimentos de glicose obtidos foram altos quando comparados, por exemplo, aos obtidos com: capim elefante 7,11g/L (Siqueira et al., 2016), Sabugo de milho 6,1 a 8,7g/L (Santos et al., 2014). Tal diferença se deve a fatores que podem afetar a hidrólise enzimática da celulose, como por exemplo, o procedimento utilizado para o pré-tratamento do material (Agbor et al., 2011; Sun & Cheng, 2002 e Zúñiga, 2010), da concentração de substrato, da atividade da celulase e das condições da reação, como temperatura, pH, bem como outros parâmetros (Sun & Cheng, 2002). Barbosa (2016), utilizando as mesmas condições, encontrou 12,63g/L de glicose, 5,01g/L de xilose, valores análogos aos encontrados nesta pesquisa.

5.3. Análise estatística

Pela metodologia de planejamento de experimentos verificou-se os efeitos significativos, bem como as interações entre as variáveis avaliadas (tempo, carga enzimática e temperatura), que influenciaram nas concentrações dos açúcares e ácido acético, encontradas no hidrolisado da rama de batata-doce provenientes da hidrólise ácida diluída deste resíduo.

5.4. Modelagem da variável celobiose

O gráfico 1 representa podemos visualizar graficamente a influência das condições do modelo matemático na concentração de celobiose da hidrólise enzimática, a longitude de cada barra é proporcional ao efeito padronizado, que é o efeito estimado dividido pelo seu erro padrão. Os termos lineares estão associados à letra “L” e os termos quadráticos a letra “Q”, e os dados demonstram os resultados da avaliação estatística para a variável, em que podemos descrever o modelo de regressão a partir dos valores codificados.

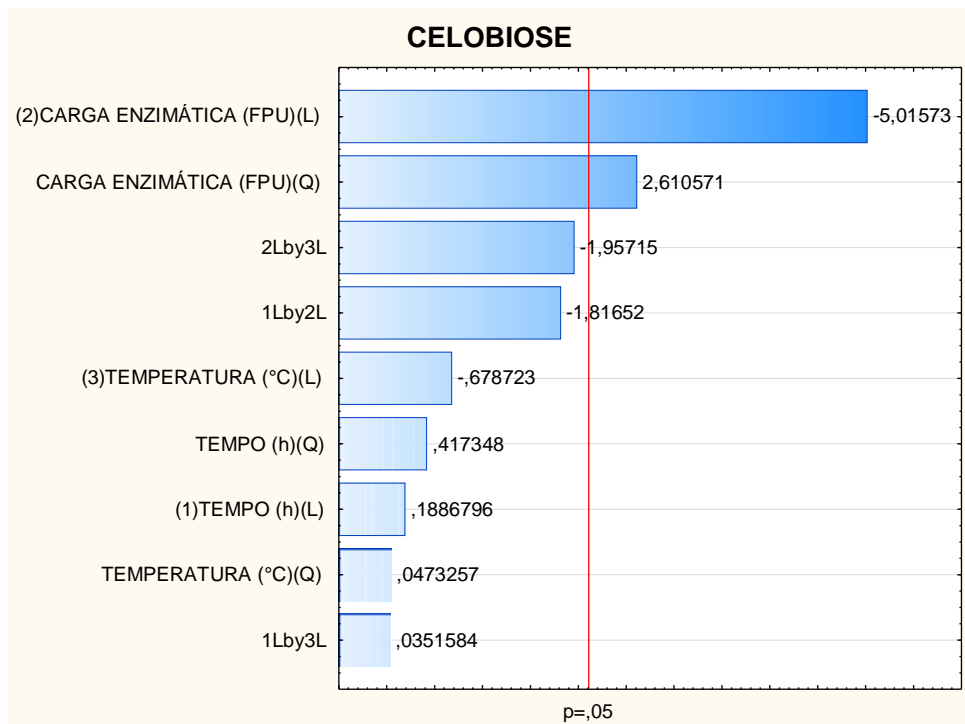


Gráfico 1- Efeito do tempo, carga e da temperatura da hidrólise enzimática.

A partir das variáveis significativas neste experimento, aplicou-se a geração de um modelo matemático que se segue abaixo:

$$Y = 0,990 - 0,957. \text{Carga (L)} + 0,971. \text{Carga (Q)} - 0,418. \text{Carga(L)} \times \text{Temperatura(L)}$$

Rodrigues e lemma (2014) relatam que diante da grande variabilidade que existe nos bioprocessos que envolvem as enzimas, pode-se considerar inicialmente significativos os parâmetros com p – valores menores que 5%, caso não haja significância desejada entre as variáveis estudadas, ou optar por parâmetros com p-valores menores que 10%. A partir disso, observa-se que as condições que mais tiveram influência nesta resposta foram carga(L), carga (Q) e a interação da carga x temperatura (L). Os valores descritos são significativos a um intervalo de confiança de 95 representado no gráfico.

Efetou-se uma análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$) do modelo reparametrizado devido à significância das variáveis encontradas, que está

apresentada na Tabela 9, que mostra as condições propostas para a modelagem da resposta de celobiose.

Tabela 8 - Análise de variância para a variável celobiose

| FONTE DE VARIAÇÃO | SQ | GL | MQ | F calculado | P |
|---------------------------|-----------------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| CARGA (L) | 18,31698 | 1 | 18,31698 | 25,15759 | 0,000106 |
| CARGA (Q) | 8,27925 | 1 | 8,27925 | 11,37120 | 0,003620 |
| CARGA(L) x TEMPERATURA(L) | 2,78890 | 1 | 2,78890 | 3,83043 | 0,066957 |
| Falta de ajuste | 4,09754 | 11 | 0,37250 | 0,51162 | 0,869878 |
| Error | 12,37753 | 17 | 0,72809 | | |
| Total SS | 45,86020 | 31 | | | |

Onde, SQ= Soma Quadrática, GL= Grau de Liberdade, MQ= Média Quadrática, F= F Calculado, P= Probabilidade.

Como pode-se verificar, o modelo foi considerado significativo (p-valor <0,05), podendo ser utilizado para representar os dados reais do experimento. Além disso, a falta de ajuste não foi significativa o que é bom, pois simboliza que o modelo se ajusta aos dados experimentais, podendo gerar a curva de contorno e o gráfico de superfície de resposta.

Uma das formas de avaliar a qualidade da falta de ajuste do modelo reparametrizado é por meio do coeficiente de determinação R^2 , que mostra como os dados obtidos se ajustam ao modelo. O coeficiente fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas (WERKEMA e AGUIAR, 2006).

O valor obtido para o R^2 foi de 0,64075, demonstrando o quanto é capaz de explicar o resultado encontrado na resposta (celobiose), indicando assim que 65,07% da variabilidade na resposta podem ser explicadas pelo modelo. Este valor é considerado satisfatório para obtenção de um modelo válido e útil para fins preditivos, quando podemos verificar na falta de ajuste que esta não foi significativa, validando, portanto, o modelo.

De acordo com Rodrigues e lemma (2014), a magnitude do coeficiente pode fornecer informações importantes para a formulação de interpretações sobre o experimento. No entanto, outros parâmetros, como a falta de ajuste, podem complementar as discussões.

A falta de ajuste é explicada devido ao fato de que o quadrado médio do erro puro apresenta um valor muito inferior ao quadrado médio da falta de

ajuste, devido à boa repetição dos ensaios (CASARIN et al., 2016; RIBEIRO et al., 2008).

Os resultados obtidos proporcionaram a geração de um gráfico de superfície de resposta (gráfico 2).

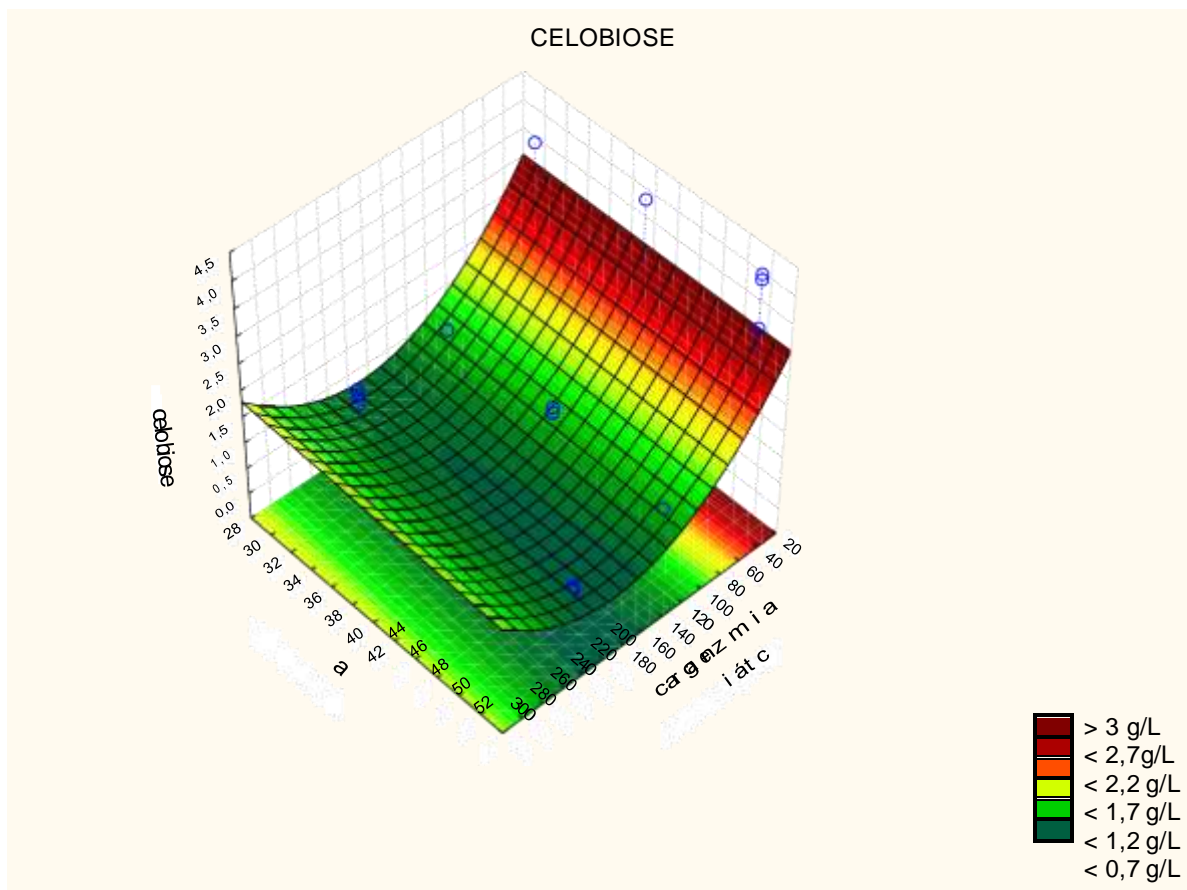


Gráfico 2- Superfície de resposta para avaliação da celobiose em função da temperatura e carga enzimática

A elevação do plano nas superfícies de resposta mostrada confirma a influência da interação entre os fatores carga e temperatura. A avaliação da celobiose no gráfico 2 mostra que a temperatura exerceu influência no processo, obtendo-se maior conversão de celobiose para a temperatura de 50°C, mantendo-se a otimização do processo. O oposto é observado na zona em verde e nota-se que na carga enzimática de (60FPU-210FPU) uma menor conversão de celobiose foi obtida, independentemente do tempo utilizado.

Houve maior concentração de celobiose no ensaio 8 (4,2 g/L), quando o tratamento aplicado foi de 72h, 30FPU e 50°C, o qual representou a maior liberação de celobiose após a hidrólise. O ensaio 6 apresentou menor liberação desse monômero de açúcar, com 0,52 g/L em 72h, 210FPU e 50°C. Podemos

verificar que houve saturação enzimática com o material lignocelulósicos, onde as enzimas se ligaram às moléculas do material lignocelulósico em um sítio de ligação provocando a saturação enzimática (SOUZA, 2016). Os produtos obtidos pela ação da enzima na celulose são glicose e celobiose, e conforme as concentrações desses monômeros no meio aumentam, as atividades das celulasas são inibidas (SUN; CHENG, 2002; FERREIRA, 2015), explicando, portanto o resultado obtido.

5.5. Modelagem da variável glicose

O gráfico 3 permite visualizar o efeito padronizado em que os valores são significativos a um intervalo de confiança de 95%. Observa-se que as influências das condições do modelo matemático na concentração de glicose no hidrolisado, que mais tiveram influência nesta resposta foram: o tempo linear, a carga linear e a interação do tempo x temperatura.

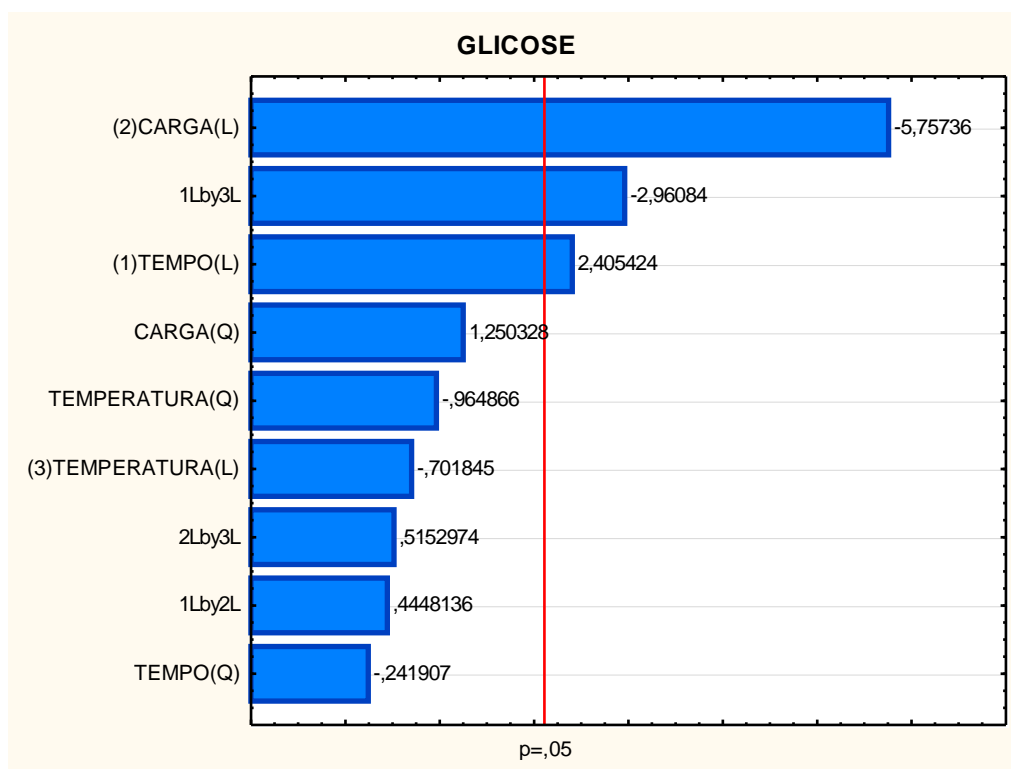


Gráfico 4- Efeito do tempo, carga e da temperatura da hidrólise enzimática.

Os resultados obtidos proporcionaram a geração de um modelo matemático como segue:

$$Y = 6,561 + 0,696 \cdot \text{Tempo (L)} - 1,666 \cdot \text{Carga(L)} - 0,957 \cdot \text{Tempo} \times \text{Temperatura}$$

Encontrado o modelo reparametrizado, e a partir das variáveis significativas, efetuou-se uma análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 8, para averiguar a significância e falta de ajuste do modelo reparametrizado gerado. Os termos em negritos foram significantes e o modelo foi considerado significativo (p -valor $< 0,05$) podendo ser utilizado para representar os dados reais do experimento.

Tabela 9 - Análise de variância para a variável glicose.

| FONTE DE VARIAÇÃO | SQ | GL | MQ | F Calculado | P |
|----------------------------------|----------------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| TEMPO(L) | 9,6605 | 1 | 9,66050 | 5,75562 | 0,028178 |
| CARGA (L) | 55,5111 | 1 | 55,51112 | 33,07293 | 0,000024 |
| TEMPO(L) x TEMPERATURA(L) | 14,7072 | 1 | 14,70723 | 8,76241 | 0,008768 |
| Falta de ajuste | 14,5288 | 11 | 1,32080 | 0,78692 | 0,650411 |
| Error | 28,5336 | 17 | 1,67845 | | |
| Total SS | 122,9412 | 31 | | | |

Onde, SQ= Soma Quadrática, GL= Grau de Liberdade, MQ= Média Quadrática, F= F Calculado, P= Probabilidade.

O valor obtido para o R^2 foi de 0,64973, indicando assim que 64,97% da variabilidade da resposta foram considerados satisfatórios para obtenção de um modelo válido e útil para fins preditivos; além disso, a falta de ajuste não foi significativa, simbolizando que o modelo se ajusta aos dados experimentais, justificado pela falta de ajuste que está em destaque na tabela 8.

Os resultados proporcionaram a geração de um gráfico de superfície de resposta (gráficos 5). A inclinação do plano no gráfico 5 confirma a influência dos fatores tempo(L) e carga enzimática(L). Pelo gráfico, fica claro que o uso máximo de tempo e mínimo de carga no experimento está diretamente relacionado com a máxima concentração de glicose.

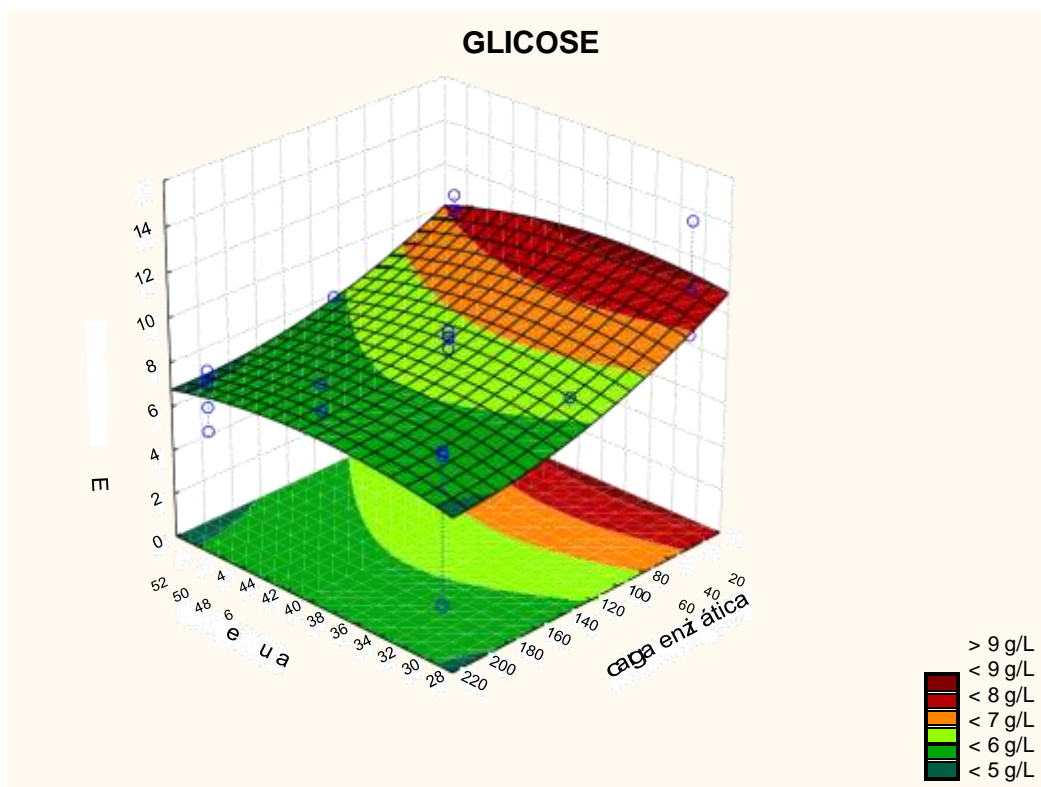


Gráfico 5 - Superfície de resposta para avaliação da glicose em função do tempo e da carga enzimática.

Observa-se que quando são aplicadas cargas enzimáticas mais baixas, tem-se a maior conversão de glicose. O oposto é observado quando foi aplicada carga enzimática mais alta verificou-se que houve menor conversão de glicose. Assim como na celobiose, a glicose tem concentrações influenciada pelos fatores carga(L), mas ao contrário da celobiose o fator tempo foi relevante na resposta glicose.

Tendo-se em vista a análise do planejamento experimental mostrado na Tabela 7, a maior concentração da hidrólise enzimática foi no ensaio 23 (11,97 g/L), quando o tratamento aplicado foi de 72h, 30FPU e 30°C, o qual representa a maior liberação de glicose após a hidrólise. O ensaio 1 apresentou menor liberação desse monômero de açúcar, com 0,13 g/L em 24h, 210FPU e 30°C. É possível observar que as melhores concentrações foram encontradas na região próxima a tonalidade vermelha, onde a carga enzimática foi de 30 a 60 PFU.

Como regra geral, a conversão do substrato aumenta com o aumento da concentração enzimática, entretanto, essa relação não é linear (GODFREY e

WEST, 1996; SATTLER et al.,1989). A hidrólise da celulose se diferencia das outras reações enzimáticas por ser uma reação heterogênea e, para garantir que a reação ocorra, o contato físico entre enzima e substrato, promovendo a adsorção das enzimas ao substrato, é um pré-requisito para a hidrólise (MANSFIELD et al., 1999). Em elevadas concentrações de enzima, pode ocorrer perda de enzimas por adsorção improdutiva no substrato ou em outros componentes, como a lignina (PALONEN et al., 2004).

Castro e Pereira Jr (2010) relataram que a possibilidade de redução da conversão com o aumento da carga enzimática ocorrerá quando ocorre à saturação dos sítios da matriz do substrato pelos biocatalisadores.

Uma das formas de melhorar o processo de sacarificação enzimática é minimizar os efeitos de resistência à transferência de massa externa, garantindo que o processo não seja limitado por este efeito. O aumento da concentração de substrato, a redução do tempo de residência e da carga de enzima, além da melhoria na atividade do complexo enzimático são fatores que contribuem para a viabilidade da via enzimática conforme relataram OUYANG et al.,(2013).

SOUZA (2016) afirmou que a otimização das condições de hidrólise é necessária para que o processo seja realizado com elevada eficiência.

5.6. Modelagem da variável xilose

O gráfico 7 possibilita visualizar a influência das condições do modelo matemático na concentração de xilose, na hidrólise enzimática. As que mais tiveram influência nesta resposta foram: carga(L), temperatura(L), o tempo(L) e a interação da carga x temperatura(L) e do tempo x temperatura(L). Nesse gráfico de Pareto (figura7), ratifica-se a influência da carga e da temperatura na resposta, ou seja, os valores são significativos a um intervalo de confiança de 95%.

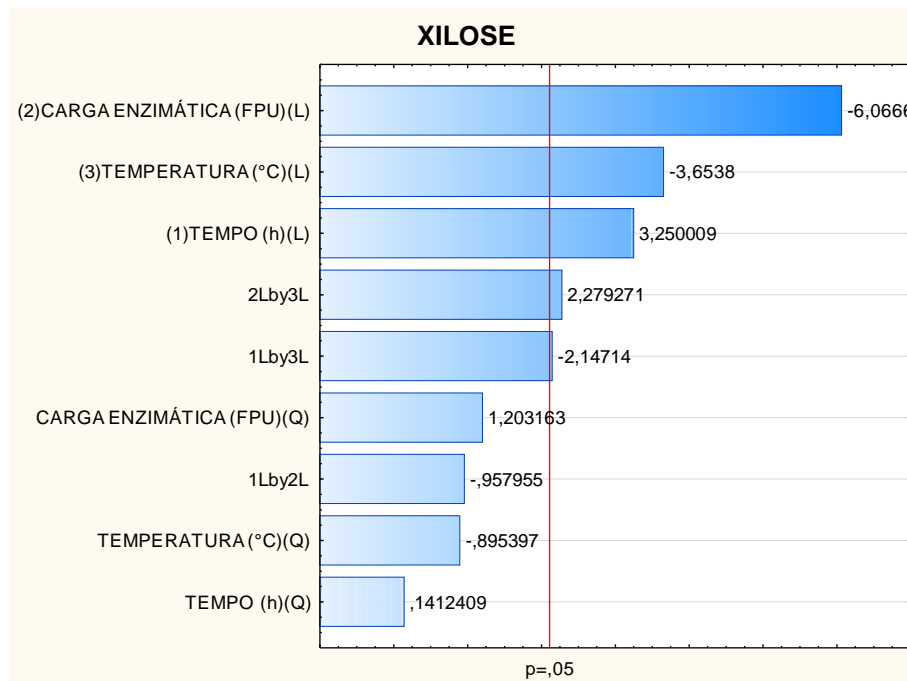


Gráfico 6 - Efeito do tempo, carga e da temperatura da hidrólise enzimática.

O valor obtido para o R^2 foi de 0,74775, indicando assim que 74,77% da variabilidade na resposta foram considerados satisfatórios para obtenção de um modelo válido e preditivo, justificado pela falta de ajuste que não foi significativa como demonstrou a ANOVA (Tabela 13). Em virtude disto, o modelo representou seguramente a relação entre os efeitos e as respostas (BOX et al., 2005; MONTGOMERY, 2017).

Os resultados obtidos proporcionaram a geração de um modelo matemático, como segue:

$$Y = 1,032 + 0,164.Tempo(L) - 0,307.Carga(L) - 0,186.Temperatura(L) - 0,121.Tempo \times Temperatura(L) + 0,130.Carga \times Temperatura(L)$$

A partir das variáveis significativas, por meio da reparametrização, efetuou-se uma análise de variância (ANOVA), que está apresentada na Tabela 13. Os termos em negritos foram significantes e o modelo foi considerado significativo (p-valor <0,05), podendo ser utilizado para representar os dados reais do experimento.

Tabela 10 - Análise de variância para a variável xilose

| FONTE DE VARIAÇÃO | SQ | GL | MQ | F calculado | P |
|---------------------------|----------|----|----------|-------------|----------|
| TEMPO (L) | 0,544500 | 1 | 0,544500 | 10,56256 | 0,004712 |
| CARGA (L) | 1,897280 | 1 | 1,897280 | 36,80466 | 0,000013 |
| TEMPERATURA(L) | 0,688205 | 1 | 0,688205 | 13,35024 | 0,001965 |
| TEMPOL x TEMPERATURA(L) | 0,237656 | 1 | 0,237656 | 4,61021 | 0,046499 |
| CARGA(L) x TEMPERATURA(L) | 0,267806 | 1 | 0,267806 | 5,19508 | 0,035838 |
| Falta de ajuste | 0,350024 | 9 | 0,038892 | 0,75444 | 0,657610 |
| Error | 0,876350 | 17 | 0,051550 | | |
| Total SS | 4,861822 | 31 | | | |

Onde, SQ= Soma Quadrática, GL= Grau de Liberdade, MQ= Média Quadrática, F= F Calculado, P= Probabilidade.

Foram gerados gráficos de superfície de resposta indicando a tendência do processo (Gráficos 8, 9 e 10). As inclinações dos planos confirmam as influências dos fatores: interação entre temperatura x carga(L) e tempo x temperatura(L). Os gráficos apresentam que o uso máximo de tempo e carga e a mínima temperatura no experimento estão diretamente relacionados com a máxima concentração de xilose.

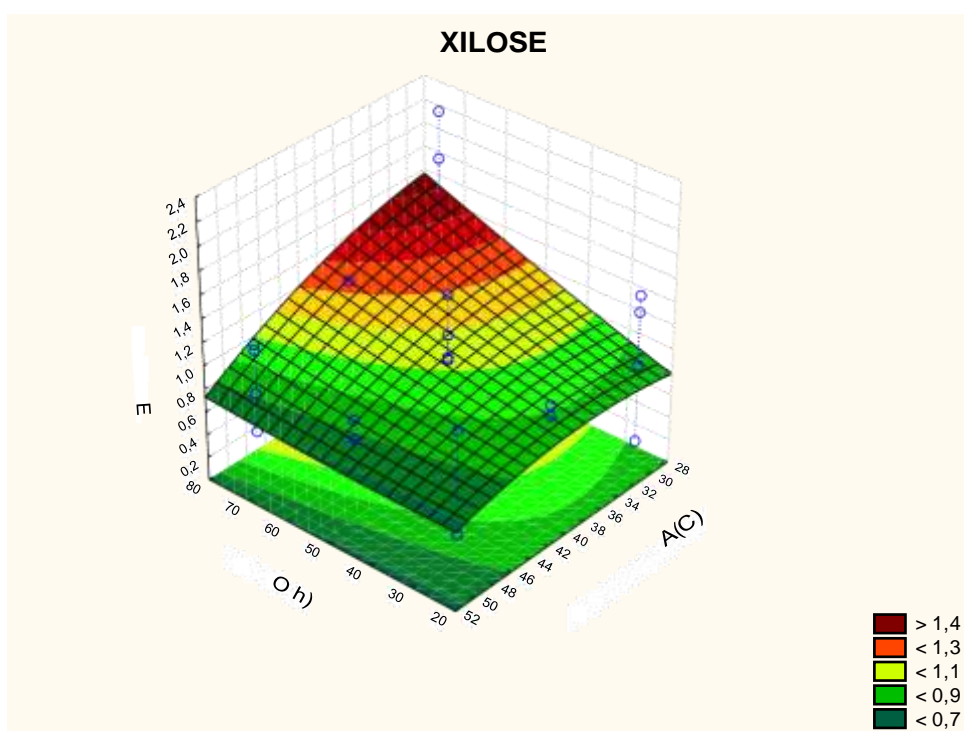


Gráfico 7 - Superfície de resposta da xilose em função do tempo e temperatura.

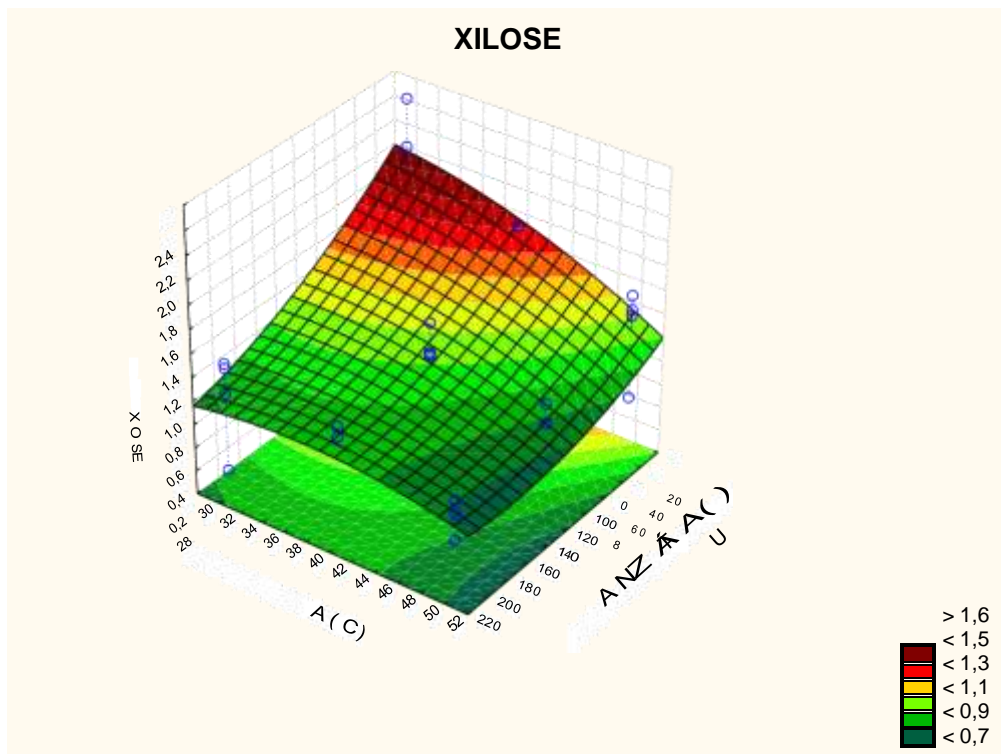


Gráfico 8- Superfície de resposta da xilose em função da temperatura e da carga enzimática.

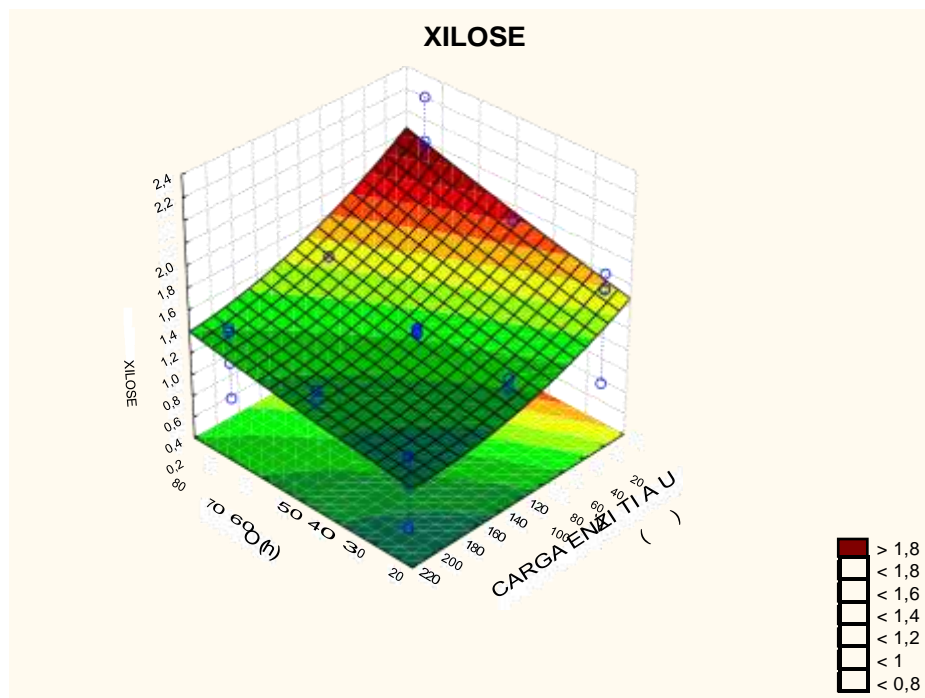


Gráfico 9- Superfície de resposta da xilose em função do tempo e da carga enzimática

Ao analisar o planejamento experimental (Tabela 7), a maior concentração da hidrólise enzimática foi no ensaio 23 (2,29 g/L), quando o tratamento aplicado foi de 72h, 30FPU e 30°C, o qual representa a maior liberação de xilose após a hidrólise. O ensaio 1 apresentou menor liberação desse monômero de açúcar com 0,13 g/L em 24h, 210FPU e 30°C. É possível observar que as melhores concentrações foram encontrados na região próxima a tonalidade vermelha, onde a temperatura foi menor e o tempo e carga maior.

Os resultados apresentados demonstraram que houve significância nas variáveis tempo e temperatura, mas a concentração de carga enzimática foi o fator que exerceu maior influência no processo. Por tais razões, este ponto será considerado na definição de uma melhor condição de planejamento para hidrólise enzimática.

5.7. Modelagem da variável ácido acético.

O gráfico 14 mostra o gráfico para a modelagem da variável dependente concentração de ácido acético da hidrólise enzimática e o efeito significativo dos principais fatores na resposta. Esta resposta apresentou tempo(L) e carga(L) significativa. O gráfico de Pareto ratifica a influência do tempo e da carga na resposta.

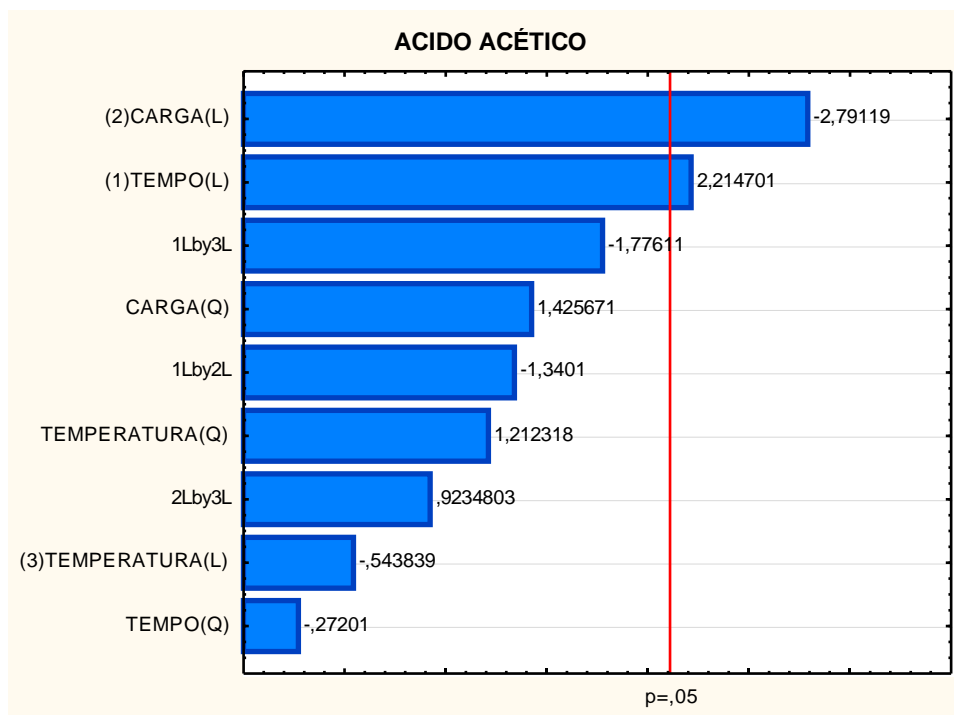


Gráfico 10 - Efeito do tempo, carga e da temperatura da hidrólise enzimática.

Os resultados obtidos proporcionaram a geração de um modelo matemático, como segue:

$$Y = 1,422 + 0,054.Tempo(L) - 0,068. Carga(L)$$

O valor obtido para o R^2 foi de 0,25962, indicando que 25,96% da variabilidade na resposta podem ser explicadas pelo modelo, e o Gráfico 15 permite avaliar a condição de ajuste, a relação entre os valores observados e preditos pelo valor de R^2 e o comportamento dos resíduos obtidos pelo modelo, permitindo-se obter um modelo válido e útil para fins preditivos, sendo observado pela falta de ajuste não significativa. A partir das variáveis significativas, por meio da reparametrização, efetuou-se uma análise de variância (ANOVA) que está apresentada na Tabela 15.

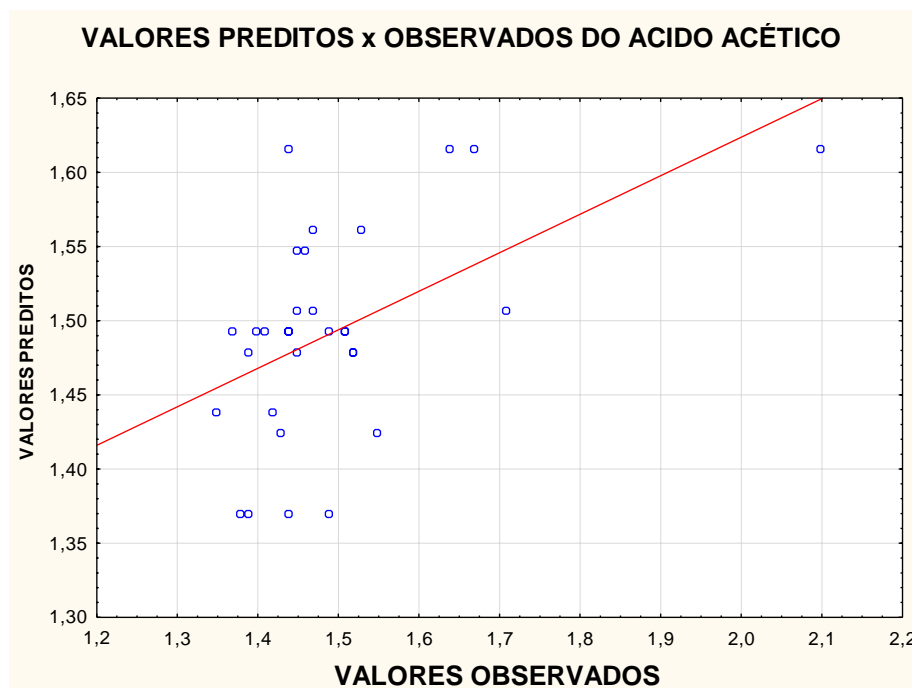


Gráfico 11- Valores observados x valores preditos

Tabela 11 - Análise de variância para a variável ácido acético.

| FONTE DE VARIAÇÃO | SQ | GL | MQ | F calculado | P |
|-------------------|-----------------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| TEMPO(L) | 0,059405 | 1 | 0,059405 | 5,057011 | 0,038075 |
| CARGA (L) | 0,093845 | 1 | 0,093845 | 7,988808 | 0,011639 |
| Falta de ajuste | 0,237338 | 12 | 0,019778 | 1,683666 | 0,158615 |
| Error | 0,199700 | 17 | 0,011747 | | |
| Total SS | 0,590288 | 31 | | | |

Onde, SQ= Soma Quadrática, GL= Grau de Liberdade, MQ= Média Quadrática, F= F Calculado, P= Probabilidade.

Foi gerado um gráfico de superfície de resposta indicando a tendência do processo (gráfico 16), confirmando a influência dos fatores tempo(L) e carga(L).

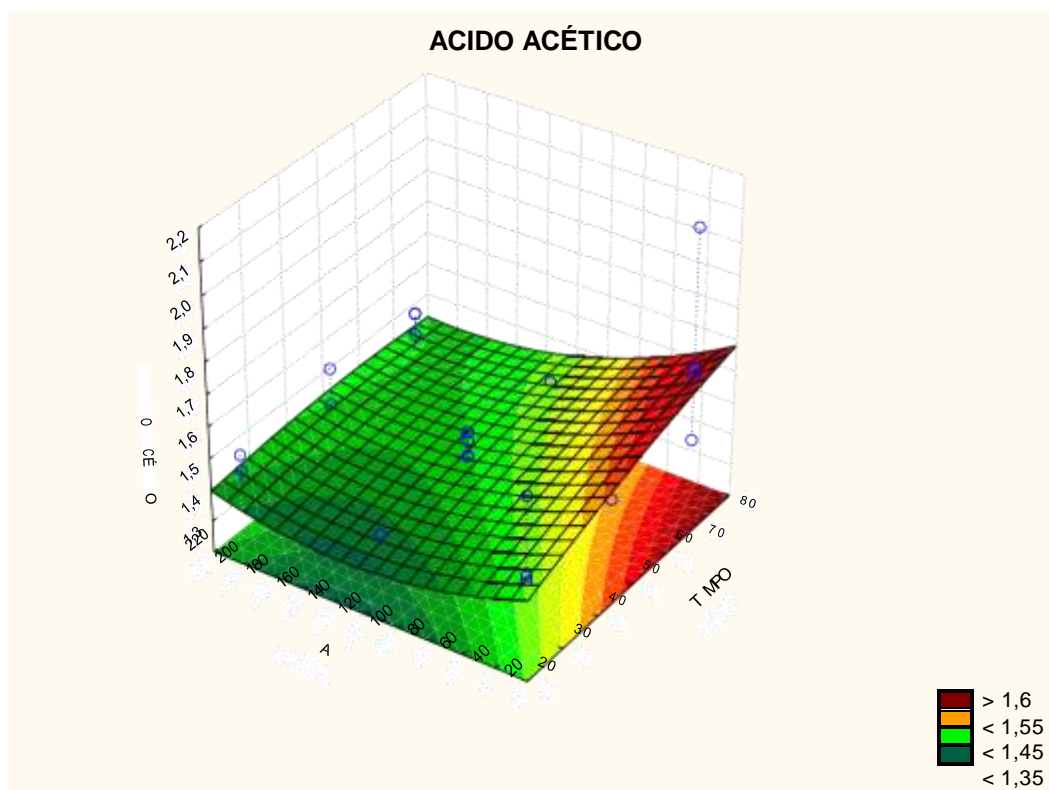


Gráfico 12- Superfície de resposta do ácido acético em função do tempo da carga enzimática.

No planejamento experimental (Tabela 7), a maior concentração de ácido acético da hidrólise enzimática foi no ensaio 23 (2,10 g/L), quando o tratamento aplicado foi de 72h, 30FPU e 30°C. O ensaio 25 apresentou menor liberação desse inibidor, com 0,95 g/L em 48h, 120FPU e 40°C. É possível observar que nas curvas de contorno, do gráfico 15, que obtiveram as maiores

concentrações foram encontradas na região próxima a tonalidade vermelha, onde a o tempo e carga foram maior.

Souza (2016), Yu et al. (2010) e Xião et al. (2013), observaram que as concentrações de ácido acético apresentaram um aumento significativo com o aumento tempo de residência do pré-tratamento. Efeito similar era esperado na hidrólise enzimática da palha da cana-de-açúcar, palha de arroz e tamarindo rosa, respectivamente.

Observa-se que quando são aplicados maiores tempos de hidrólise, tem-se maior conversão de ácido acético. O aumento da concentração de ácido acético é explicado pela degradação da hemicelulose uma vez que este é proveniente do grupo acetil da hemicelulose (SOUZA, 2016).

5.8. Inibidores Hidroximetilfurfural e Furfural.

Os efeitos dos fatores hidrolíticos ocasionaram degradação, contribuindo para manter baixas as concentrações de HMF e furfural, e como os parâmetros do pré-tratamento utilizado foram seguindo o método descrito por BARBOSA (2016), já era esperado baixas concentrações de HMF e furfural na otimização da hidrólise enzimática. De acordo com o autor, a concentração de HMF aumentava em temperaturas mais baixas devido à degradação de hexoses provenientes das hemiceluloses (manose, glicose). Com o aumento da temperatura os valores da degradação de HMF se tornaram equivalentes à sua taxa de produção, fazendo com que concentração deste chega-se a zero nessas condições. Um novo aumento da temperatura a valores máximos do experimento levaria à disponibilidade de mais glicose no hidrolisado, sendo que esta, por sua vez, permitiria que a concentração de HMF também aumentasse conjuntamente.

As variações nos teores de furfural e HMF apresentaram perfil similar ao do ácido acético, aumentando com o aumento do tempo de residência. Ambos compostos são provenientes da degradação dos açúcares, sendo o furfural (maiores concentrações) correspondente à degradação da xilose e arabinose e o HMF da glicose (YU et al., 2010).

RODRIGUES (2009) relatou que a hidrólise que proporciona maiores rendimentos se dá quando realizada sob pressão ambiente e temperaturas moderadas, (50-60°C), não formando subprodutos indesejáveis.

5.9. Estimativa da produção de etanol

O rendimento de ART (glicose) foi de 87%, que segundo Finguerut e colaboradores (1985) a cada 100kg de glicose é produzido 51,1 kg de etanol, estimando assim o valor de 44,46kg de etanol quando se estimou a produção neste experimento. Os ART encontrados por Teixeira et al. (1997) para o colmo do sorgo sacarino e da cana- de-açúcar foram 30,91 e 33 ,95 (% MS) e com uma estimativa de produção de etanol 66,88 e 54,70 L/t.

6. CONCLUSÕES

Por meio do Delineamento Composto Central (DCC), foi possível obter um modelo significativo para explicar as variáveis temperaturas, tempo e carga enzimática sobre a liberação de açúcares fermentescíveis e inibidores no processo de otimização da hidrólise enzimática de ramas de batata-doce.

- De acordo com o Delineamento Composto Central (DCC), a maior liberação de celobiose da hidrólise enzimática foi na condição de 50°C, 30FPU e 72h com 4,20g/L, e para glicose e xilose foi em: 30°C, 30FPU e 72h com 11,97g/L e 2,29g/L respectivamente. A maior formação do inibidor ácido acético foi em 30°C, 30FPU e 72h. Para os inibidores HMF e furfural baixas as concentrações foram obtidas
- As superfícies de resposta demonstraram um contorno elíptico, o que sugere que as condições de operação foram razoavelmente definidas para o processo de otimização da hidrólise enzimática para rama de batata-doce.
- Os ensaios do planejamento experimental com carga enzimática de 30 a 60FPU, tempo de 72h e temperatura 30°C proporcionaram maior rendimento de hidrólise da celulose, mostrando a eficiência da hidrólise da rama de batata-doce e seu potencial na produção de etanol celulósico.
- Uma das vantagens em utilizar o delineamento de composto central para a otimização é ter um excelente planejamento aplicando várias técnicas estatísticas gerando bons resultados do processo. Em suma, a validação dos modelos determinados pelo planejamento experimental para a conversão e concentração de glicose demonstra que a otimização planejada foi alcançada.
- Os resultados estimados para produção de etanol foi de 44,45kg de etanol.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, Y. V.; NASCIMENTO, H. R. A Produção da cana-de-açúcar e de etanol nas novas fronteiras agrícolas: o estado do Tocantins. **Revista Liberato, Novo Hamburgo**, v. 17, n. 27, p. 01-118, jan./jun. 2016.

Almeida, J. R. M., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hagerdal, B., Lidén, G., Grauslund, M. (2007) Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 82, 340- 349.

ALMEIDA, R. R. **Estudo do bagaço de mandioca (*Manihot esculenta* C.), nativo e tratado com α -amilase e amiloglucosidase, por meio de técnicas termoanalíticas**. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2009.

ALVIM, J. C.; ALVIM, F. A. L. S.; SALES, V. H. G.; SALES, P. V. G.; OLIVEIRA, E. M.; COSTA, A. C. R. Biorrefinarias: conceitos, classificação, matérias primas e produtos. **J. Bioen. Food Sci.**, v. 1, n.3: p.61-77, 2014.

Barbosa, R. S. **Otimização do pré-tratamento com ácido diluído das ramas de batata-doce (*Ipomoea batatas* lam.(L))**.Dissertação (Mestrado em Agroenergia – Universidade Federal do Tocantins) – Palmas: UFT, 2016.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n.2, p. 858–875, 2011.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento de seleção de fungos celulolíticos pra hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Ciências – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz) – Piracicaba, 2011.

Barl, B.; Biliaderis, C. G.; Murray, D. M.; MacGregor, A. W.; **J. Sci. Food Agric.** 1991, 56, 195.

BNDES; CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.

Disponível em: <<http://www.bioetanoldcana.org/>>
Acesso em: abril 2017.

BOX, G. E.; HUMTER, J.S.; HUNTER, W.G. **Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery**. 2nd. ed. Wiley-Interscience New York, 2005.

Brown, R. M.; **Pure Appl. Chem.** 1999, 71, 767.

CAMACHO, I. A. O. **Produção de resíduos sólidos de matérias-primas amiláceas na fabricação de bioetanol para análise de segurança em alimentação de ratos wistar**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP - Campus de Botucatu, 2013.

CARA, C.; RUIZ, E.; BALLESTEROS, I.; NEGRO, M. J.; CASTRO, E. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. **Process Biochemistry**, v.41, p.423-429, 2006.

CASARIN, F. et al. Planejamento experimental do processo de secagem da amora-preta (*Rubus sp*) para a produção de farinha enriquecida com compostos bioativos. **Brazilian Journal of food Technology**, v.19, 2016

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

CHEMMES, C. S. et al. Estudos de métodos físico-químicos no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de etanol de segunda geração. **Revista Unifacs**, 2013.

DERMIBAS A. Bioethanol from cellulosic materials: are newable motor fuel from biomass. **Energy Sources**, v. 27, p. 327-333, 2005.

Di Cai, Zhongshi Dong, Yong Wang, Changjing Chen, Ping Li, Peiyong Qin, Zheng Wang, Tianwei Tan. Biorenew of corn cob for microbial lipid and bio-ethanol production: An environmental friendly process. **Bioresource Technology** 211(2016) 677–684.

EMBRAPA HORTALIÇAS. Disponível em: <https://www.embrapa.br/hortalicas>. Acesso em: 19 de abril de 2016.

Fengel, D.; Wegener, G.; Wood Chemistry, Ultrastruture, Reactions, Walter de Gruyter: Berlin, 1989

Ferreira, S.; Duartea, A. P.; Ribeiro, M.H.L.; Queiroz, J. A.; Domingues, F. C. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. **Biochemical Engineering Journal** 45 (2009) 192–200.

FERREIRA-LEITAO, V. et al. **Biomass Residues in Brazil: availability and potential uses**. Waste Biomass Valor, v. 1, p. 65-76, 2010.

FILHO, WGV; MENDES, BP. In: Tecnologia. Usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas. Fermentação alcoólica de raízes tropicais. São Paulo: **Fundação Cargill**, 2003. V. 3, p. 530-575.

Finguerut, J. et al. 1985. Estequiometria da fermentação alcoólica a partir do caldo de cana. Boletim Técnico Opersucar, São Paulo, Brasil, 33: 45-48.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 70–78, 2012.

GARCIA, D. **Estudo da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte**. 2012. 153 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

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

HAGHIGHI MOOD, S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

HAHN-HÄGERDAL, Bärbel et al. Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549-556, 2006.

IEA - International Energy Agency, Biofuels for Transport- Na International Perspective; 2004.
Disponível em: <<http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2004/biofuels2004.pdf>>. Acesso em: abril. 2017.

IEA - International Energy Agency. Technology Roadmaps: Biofuels for transport. p.56. 2011.

Kim, Y.; Ximenes, E.; Moiser, N.; Ladisch, M. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme Microb. Technol.** 2011, 48, 408–415.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Review article. **Journal of Biotechnology**, 56:1-24, 1997.

LEE, Y. H., FAN, L. T., 1983. "Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose (II): Analysis of extended hydrolysis times". **Biotechnology and Bioengineering**, v.25, pp. 936-966.

LEAL, M. R.L.; LEITE, R. C. C; O **Biocombustível no Brasil**. Novos Estudos – CEBRAP 78, p.15-21, jul. 2007.

LINDE, M.; GALBE, M.; ZACCHI, G. (2006). Simultaneous Saccharification and Fermentation of steam-pretreated barley straw. Lund University. **28th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Nashville, Tennessee.

Lopes da Silva, T., Roseiro, J. C., Reis, A. (2012) Applications and perspectives of multiparameter flow cytometry to microbial biofuels production processes. **Trends in Biotechnology**.30 (4), 225-232

Lu, Y.; Yang, B.; Gregg, D.; Saddler, J. N.; Mansfield, S. D.; Appl. **Biochem. Biotechnol.** 2002, 98, 641.

LYND, L.R. et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and iotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.66, n.3, p. 506-577, 2002.

MANSFIELD, S.D., MOONEY, C., SADDLER, J.N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 15, p.804-816, 1999.

MASIERO, SaraScomazzom. **Microucina de Batata-doce: Viabilidade econômica e técnica**. 2012. 141f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Escola de Engenharia, Faculdade Federal do Rio Grande do Sul,

Porto Alegre-RS.

MARTIN, C.; GALBE, M.; NILVEBRANT, N.; JÖNSSON, L.J. (2002). Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 699-715.

MENEZES, T.J.B. **Etanol, o combustível do Brasil**. Ed. Agronômica Ceres, São Paulo. 1980. 233p.

MONTES, S. M. N. M.; FIRETTI, R.; GOLLA, A. R.; TARSITANO, M. A. A. Custos e rentabilidade da batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) na Região Oeste do Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, v. 36, n. 4, p. 15-23, 2006.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 9th. ed. John Wiley & Sons, 2017.

NETO, E. F. S.; LEAL, F. P. S. Biocombustíveis: uma vantagem para o futuro. Bolsista de Valor: **Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**, v. 2, n. 1, p. 11-16, 2012.

OGEDA, T. L., PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p.1549-1558, 2010.

OKAMOTO, K.; NITTA, Y.; MAEKAWAB, N.; YANASEA, H. Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*. **Enzyme and Microbial Technology** v. 48, n. 3, p. 273–277, march 2011.

OLEA, E.H.; CARRILLO, E.P.; SALDÍVAR, S.O.S. Effects of different acidhydrolyses on the conversion of sweet sorghum bagasse into C5 and C6 sugars and yeast inhibitors using response surface methodology. **Bioresour Technol.**, v. 119, p. 216-223, 2012.

OUYANG, J. et al. Enzymatic hydrolysis, adsorption, and recycling during hydrolysis of bagasse sulfite pulp. **Bioresour. Technol.**, v. 146, p. 288-293, 2013.

PAES, C. L. **Embrapa avalia novas fontes para produzir etanol**. Embrapa

Cerrados, Planaltina-DF, 20 jan. 2010.

Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/noticias/noticia_completa/167/>.

Acesso em: 20 abril de 2017.

PALONEN, H. **Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose.** Tese de Doutorado. University of Technology. Finland, 2004.

Ping Li, Di Cai, Zhangfeng Luo, Peiyong Qin, Changjing Chen, Yong Wang, Changwei Zhang, Zheng Wang, Tianwei Tan. Effect of acid pretreatment on different parts of corn stalk for second generation ethanol production.

Bioresource Technology 206 (2016) 86–92.

PUPPAN, Daniel. Environmental evaluation of biofuels. **Periodica Polytechnica Social and Management Sciences**, v. 10, n. 1, p. 95, 2002.

Qureshi, N., Bowman, M. J., Saha, B. C., Hector, R., Berhow, M. A., Cotta, M. A. (2011). Effect of celulosic sugar degradation products (furfural and hydroxymethyl furfural) on acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation using *Clostridium beijerinckii* P260. **Food and Bioproducts Processing**. 90, 533-540.

Reis, G. C.; Mota, M. P.; Silva, E. S.; Marinho, B. A. J.; Costa, C. R.; Sata`Ana, E. V. P. O MERCADO PARA A CANA DE AÇÚCAR E A DISPONIBILIDADE DE ÁREAS NO ESTADO DO TOCANTINS. **ISSN 2179 – 5649, V JICE©2014.**

RIBEIRO, S. C. et al. Otimização da desidratação osmótica de filés de mapará (*Hypophthalmus edentatus*) através da metodologia de superfície de resposta. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 485-492, 2008.

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

RODRIGUES, J. A. R. Do engenho à biorrefinaria. A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Revista Quim. Nova**, Vol. 34, No. 7, 1242-1254, 2011.

SAAD, M. B. W. **Avaliação técnica e econômica preliminar da produção De etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana de açúcar.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia industrial – Escola de Engenharia Lorena) – São Paulo: EEL, 2010.

SANTOS, D.S.; CAMELO, A.C.; RODRIGUES, K.C.; CARLOS, L.C.; PEREIRA Jr., N. (2010). Ethanol production from sugarcane bagasse by *Zymomonas mobilis* using Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 93-105.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova** vol.35 no. 5 São Paulo, 2012.

Santos, F. A.; Queiroz, J.H.; Colodette, J. L.; Manfredi, M.; Queiroz, M. E. L. R.; Caldas, C. S.; Soares, F. E. F. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à Produção de etanol celulósico. **Quim. Nova**, Vol. 37, No. 1, 56-62, 2014.

SANTOS, M. S. R.; PIMENTEL, W. R. O.; SILVA, M. C. S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; CRUZ, A. J. G. Avaliação do pré-tratamento ácido do sabugo de Milho visando a produção de etanol 2G. XX **Congresso Brasileiro de Química** – Florianópolis, 2014.

SARKAR, N. et al. **Bioethanol production from agricultural wastes: An overview**. Renewable Energy, Índia, p.19-27, 2012.

SATTLER W. et al. The effect enzyme concentration on the rate of the hydrolysis of cellulose. **Biotechnol Bioeng**, 1989, 33: 1221–1234.

Schulz, M. A. **Produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: polpa e cascas de banana**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos –Universidade da Região de Joinville) – Joinville: UNIVILLE, 2010.

SILVA, J.B. **Cultura da batata-doce**, 2004.
Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/batatadoce/index.htm>>. Acesso em 9 junho 2017.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

SILVEIRA, M. A., coord.; **Boletim Técnico** – UFT, Palmas, Brasil, 2008.

SILVEIRA, M. A., coord.; **Boletim Técnico** – UFT, Palmas, Brasil, 2014.

SIQUEIRA, L. N.; GUARDA, E. A.; GUARDA, P. M.; SILVA, R. B. R.; BARBOSA, R. S. Rendimento de hidrólise e produção de etanol lignocelulósico a partir de biomassa de capim elefante. **J.Bioen. food Sci.**, v.3, n.4, p.191-196, 2016.

SOUZA, R. B. A. **Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha da cana-de-açúcar**. 106f. Tese de Doutorado em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos. São Paulo, 2016.

SLUITER, A. et al. Determination of extractives in biomass. Laboratory Analytical Procedure. **National Renewable Energy Laboratory. Golden: Colorado**, 2008.

SUBHEDAR, P.; GOGATE, P. R. Intensification of enzymatic hydrolysis of lignocellulose using ultrasound for efficient bioethanol production: A Review. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 11816-11828, 2013.

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

TAHERZADEH M, KARIMI K, (2009). Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources** 2 (4), pp. 707-738.

Teixeira, C.G.; Jardine, J.G.; Beisman, D.A. 1997. Utilização do sorgo sacarino como matéria-prima complementar à cana-de-açúcar para obtenção de etanol em microdestilaria. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 17:248-251, 1997.

TSAO, G. T., Cellulosic material as a renewable resource. **Process Biochemistry**, v. 10, p. 12-14, 1978.

WERKEMA, M. C. C.; AGUIAR, S. **Análise de regressão: como entender o relacionamento das variáveis de um processo**. Volume 7 ed. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni da Escola engenharia da UFMG, 2006.

Wikandari, R., Millati, R., Syamsiyah, S., Muriana, R., Ayuningsih, Y. (2010) Effect of furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid on indigeneous

microbial isolate for bioethanol production. **Agricultural Journal**. (5) 2, 105-109.

Wiselogle, A.; Tyson, J.; Johnsson, D. Em Handbook on Bioethanol: Production and Utilization; Wyman, C. E., ed.; Taylor & Francis: Washington, 1996, p. 105

XIÃO, L. P. et al. Hydrothermal treatment and enzymatic hydrolysis of *Tamarix ramosissima*: Evaluation of the process as a conversion method in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 73-81, 2013.

YU, Q. et al. Pretreatment of Rice Straw by a Hot-Compressed Water Process for Enzymatic Hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 160, p. 539-551, 2010.

ZHANG, M.; SHUKLA, P.; AYYACHAMY, M; PERMAUL, K; SINGH, S. (2009). Improved bioethanol production through Simultaneous Saccharification and Fermentation of lignocellulosic agricultural wastes by *Kluyveromyces marxianus* 6556. **Applied Microbiology and Biotechnology**, in press.

Zhang, Y. H. P.; *J. Ind. Microbiol Biotechnol*. 2008, 35, 367.

Zheng, Y. I.; Pan, Z.; Zhang, R.; Wang, D.; **Appl. Energy** 2009, 86, 2459.

ZHU, J.Y; ZHU, W.; BRYAN, O.P.; DIEN, B.S; TIAN, S.; GLEISNER, R.; PAN, X.J. (2010). Ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine: preliminary evaluation of mass balance and process energy efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, in press.