

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**BIOMASSA DERIVADA DE CANA-DE-AÇÚCAR E CANA
ENERGIA SUBMETIDAS A HIDRÓLISE ÁCIDA E
ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

Juliana Pelegrini Roviero

Tecnóloga em Biocombustíveis

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**BIOMASSA DERIVADA DE CANA-DE-AÇÚCAR E CANA
ENERGIA SUBMETIDAS A HIDRÓLISE ÁCIDA E
ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

Juliana Pelegrini Roviero
Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton
Coorientadora: Dra. Sarita Cândida Rabelo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

R875b Roviero, Juliana Pelegrini
Biomassa derivada de cana-de-açúcar e cana energia
submetidas a hidrólise ácida e enzimática para produção de etanol /
Juliana Pelegrini Roviero. -- Jaboticabal, 2017
xxiii, 119 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Márcia Justino Rossini Mutton
Coorientadora: Sarita Cândida Rabelo
Banca examinadora: Carlos Eduardo Vaz Rossell, Maria das
Graças de Almeida Felipe, Sandra Regina Ceccato Antonini, Eleni
Gomes.
Bibliografia

1. Hemicelulose. 2. Xilose. 3. Energia renovável. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:663.52

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal




CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: BIOMASSA DERIVADA DE CANA-DE-AÇÚCAR E CANA ENERGIA SUBMETIDAS
A HIDRÓLISE ÁCIDA E ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

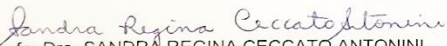
AUTORA: JULIANA PELEGRINI ROVIERO
ORIENTADORA: MARCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON
COORIENTADORA: SARITA CANDIDA RABELO

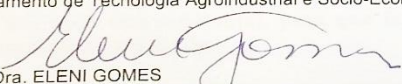
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em
MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pesquisador Dr. CARLOS EDUARDO VAZ ROSSELL
CTBE / Campinas, SP


Profa. Dra. MARIA DAS GRAÇAS DE ALMEIDA FELIPE
Depto de Biotecnologia / USP / Escola de Engenharia de Lorena, SP


Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI
Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural do CCA / UFSCar - Araras, SP


Profa. Dra. ELENI GOMES
Departamento de Biologia / UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto, SP

Jaboticabal, 03 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA PELEGRINI ROVIERO – nasceu aos 25 de Novembro de 1988, na cidade de Jaboticabal, estado de São Paulo. Em Fevereiro de 2008 ingressou no curso de Tecnologia em Biocombustíveis na Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, recebendo o título Tecnóloga em Biocombustíveis em Dezembro de 2010. A partir de 2008 passou a integrar o grupo de pesquisas de Processos Biotecnológicos Aplicados à Agroindústria do Laboratório de Tecnologia em açúcar e álcool, participando do desenvolvimento diversos projetos. Em março de 2011 ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da FCAV – UNESP obtendo o título de mestre em fevereiro de 2013. A partir de março deu início ao doutorado no Programa de Pós-graduação da FCAV – UNESP obtendo o título de Doutora em Microbiologia Agropecuária em fevereiro de 2017. Atualmente é docente na Escola de Ensino médio e técnico Bento Carlos Botelho do Amaral – Etec na cidade de Guariba, no curso Técnico em açúcar e álcool.

*“Haverá um momento em que teremos que escolher entre
o que é fácil e o que é certo”*

Alvo Dumbledore

*A minha família,
em especial a minha mãe Angela,
pela confiança, paciência, apoio, vida!*

DEDICO

*A Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton, pelo conhecimento,
oportunidade,
por acreditar em mim.*

OFEREÇO

AGRADEÇO

Imensamente a Profa. Dra. Márcia Mutton por me acolher em seu laboratório. Com certeza todo o conhecimento adquirido através desta oportunidade, me fizeram não só uma melhor profissional, mas também uma pessoa melhor.

Ao Prof. Dr. Miguel Mutton que sempre aparecia com um sorriso no rosto para nos passar tranquilidade.

A banca examinadora, pela disponibilidade e pela imensa contribuição.

À FCAV/UNESP Jaboticabal, principalmente ao curso de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, e a CAPES pela bolsa.

A Usina Santa Adélia pelo material cedido.

Aos motoristas da FCAV/Unesp, sem os quais seria muito mais difícil realizar este trabalho.

Ao CTBE, em nome da Dra. Sarita Candida Rabelo, coorientadora deste trabalho, que muito colaborou na elaboração e no decorrer do experimento.

À Profa. Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe e sua equipe, nas pessoas do Andrés e Alejandra, que colaboraram para a realização das análises deste experimento.

Ao pessoal do Lab. TAA: Sérgio, Gustavo, Lidy, Osania, Marcel, Aline, Nayara, Vitor, Cristhyane, Franciele, Karen, Matheus, Welton, Letícia, Mara, Graciane pela sincera amizade.

Ao Tiago, que junto com sua família, foram enviados por Deus para fazerem parte da minha vida para sempre.

Principalmente agradeço à minha mãe pela paciência, compreensão, companheirismo... tudo o que eu fizer nesta vida vai ser para ela e por ela!

Enfim, agradeço a todas as pessoas que passaram em algum momento pela minha vida, principalmente as que torcem por mim.

OBRIGADA!

Sumário

LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE FIGURAS	XVI
RESUMO.....	XX
ABSTRACT	XXII
1. INTRODUÇÃO	24
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 Matérias-primas para produção de etanol	28
2.2 Cana-de-açúcar.....	30
2.3 Biomassa lignocelulosica	31
2.3.1 Bagaço de cana-de-açúcar	32
2.3.2 Palhada de cana-de-açúcar	34
2.3.3 Cana energia	35
2.4 Estrutura e ultraestrutura da parede celular vegetal.....	36
2.4.1 Celulose (homopolímero)	36
2.4.2 Hemicelulose (heteropolímero)	37
2.4.3 Lignina.....	39
2.4.4 Extrativos.....	40
2.4.5 Cinzas totais.....	40
2.5 Pré-tratamentos.....	41
2.5.1 Pré-tratamento com ácido diluído.....	43
2.5.2 Compostos inibidores da fermentação gerados no pré-tratamento ...	44
2.6 Leveduras fermentadoras.....	45
2.6.1 Rhodotorula glutinis.....	46
2.6.2 Metabolismo de glicose, xilose e arabinose para produção de etanol	47
2.7 Hidrólise enzimática	49
2.8 Nutrientes na fermentação	49

2.9 Co-geração de energia elétrica	52
2.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	53
3. MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1. Obtenção da matéria-prima	54
3.1.1 Características das variedades estudadas	54
3.2. Caracterização da matéria-prima	55
3.2.1 Determinação do teor de cinzas totais na biomassa	55
3.2.2 Determinação dos extrativos na biomassa	56
3.2.3 Determinação de carboidratos e lignina na biomassa	56
3.3 Condições de pré-tratamento	57
3.4 Concentração, destoxificação e preparo do mosto	58
3.5 Reativação da levedura	59
3.6 Condução da fermentação	60
3.6.1. Rendimento Fermentativo	60
3.7 Atividade da enzima e hidrólise enzimática	61
3.7.1 Determinação da atividade enzimática da celulase	61
3.7.2 Hidrólise enzimática	61
3.7.3 Rendimento da hidrólise enzimática	62
3.8 Determinações de macro e micronutrientes	62
3.9 Poder calorífico	63
3.10 Microscopia eletrônica de varredura	63
3.11 Análise Estatística	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 Caracterização das biomassas	65
4.1.1 In natura	65
4.1.2 Após o pré-tratamento	66
4.1.3 Após a hidrólise enzimática	67

4.2 Análises realizadas no licor	68
4.2.1 Açúcares e produtos de degradação da lignina	68
4.2.2 Avaliação do licor concentrado.....	70
4.2.3 Resultados da destoxificação do licor e preparo do mosto	70
4.3 Fermentação do licor.....	72
4.3.1 Análises de viabilidade celular	72
4.3.2 Assimilação de açúcares na fermentação do licor	76
4.3.3 Comportamento do ácido acético na fermentação do licor.....	78
4.3.4 Produção de etanol na fermentação do licor	79
4.3.5 Análise do rendimento fermentativo	79
4.3.6 Análises do vinho após a fermentação do licor	80
4.4 Hidrólise enzimática da celulignina	82
4.4.1 Atividade da enzima celulase	82
4.4.2 Processo de hidrólise enzimática	83
4.4.3 Rendimento da hidrólise enzimática.....	85
4.5 Nutrientes nas biomassas	86
4.6 Resultados das análises de poder calorífico das biomassas	95
4.7 Resultados da análise de microscopia eletrônica de varredura	95
4.7.1 MEV da biomassa (palha) da variedade RB855453 in natura, após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática	96
4.7.2 MEV da biomassa (palha) da variedade SP87-365 in natura, após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática	97
4.7.3 MEV da biomassa (palha) da variedade CTC 4 in natura, após o pré- tratamento e após a hidrólise enzimática.....	98
4.7.4 MEV da biomassa bagaço de cana in natura, após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática.....	99
4.7.5 MEV da biomassa cana energia IACBIO 1249 in natura, após o pré- tratamento e após a hidrólise enzimática.....	100

4.7.6 MEV da biomassa cana energia IACBIO 1230 in natura, após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática.....	101
5. CONCLUSÕES	103
6. REFERÊNCIAS.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição e características das matérias-primas a serem utilizadas para produção de etanol.....	29
Tabela 2. Tipos de pré-tratamentos utilizados para a deslignificação da matéria-prima.	42
Tabela 3. Resultados médios da composição obtidos após o pré tratamento ácido de Volume de licor, Peso de Celulignina e Umidade.....	58
Tabela 4. Representação das condições de hidrólise enzimática em função da umidade de cada amostra.	61
Tabela 5. Caracterização das biomassas in natura com relação as porcentagens de extrativos, cinzas totais, celulose, hemicelulose e lignina.	65
Tabela 6. Caracterização da biomassas pré-tratadas com relação as porcentagens de cinzas totais, celulose, hemicelulose e lignina.....	66
Tabela 7. Caracterização das biomassas após hidrólise enzimática com relação as porcentagens de cinzas totais, celulose, hemicelulose e lignina.	67
Tabela 8. Resultados da composição média do licor obtido após o pré-tratamento com ácido diluído com relação a glicose, xilose, arabinose, ácido acético e celobiose.....	68
Tabela 9. Resultados médios de brix, pH e compostos fenólicos no licor obtido após pré-tratamento com ácido diluído.....	69
Tabela 10. Resultados médios de composição do licor após o processo de concentração.....	70
Tabela 11. Resultados médios de glicose, xilose, arabinose e ácido acético no mosto.	71
Tabela 12. Resultados médios de composição do mosto após o processo de concentração e destoxificação do licor com relação ao brix, pH e compostos fenólicos.....	72

Tabela 13. Resultados de viabilidade celular, viabilidade de brotos e brotamentos da fermentação do mosto obtido através da concentração e destoxificação do licor.....	73
Tabela 14. Resultados médios de brix, pH, acidez total e glicerol no vinho obtido após a fermentação do licor.....	81
Tabela 15. Resultados médios de brix, acidez total e compostos fenólicos no hidrolisado.....	84
Tabela 16. Resultados médios dos nutrientes potássio, magnésio, cobre, zinco, manganês, cálcio, ferro, sódio, nitrogênio e fósforo na palha da variedade RB855453 in natura, após o pré-tratamento, após a hidrólise enzimática, no licor e no hidrolisado enzimático.....	89
Tabela 17. Resultados médios dos nutrientes potássio, magnésio, cobre, zinco, manganês, cálcio, ferro, sódio, nitrogênio e fósforo na palha da variedade SP87-365 in natura, após o pré-tratamento, após a hidrólise enzimática, no licor e no hidrolisado enzimático.....	90
Tabela 18. Resultados médios dos nutrientes potássio, magnésio, cobre, zinco, manganês, cálcio, ferro, sódio, nitrogênio e fósforo na palha da variedade CTC 4 in natura, após o pré-tratamento, após a hidrólise enzimática, no licor e no hidrolisado enzimático.....	91
Tabela 19. Resultados médios dos nutrientes potássio, magnésio, cobre, zinco, manganês, cálcio, ferro, sódio, nitrogênio e fósforo no bagaço in natura, após o pré-tratamento, após a hidrólise enzimática, no licor e no hidrolisado enzimático.....	92
Tabela 20. Resultados médios dos nutrientes potássio, magnésio, cobre, zinco, manganês, cálcio, ferro, sódio, nitrogênio e fósforo no clone de cana energia IACBIO 1249 in natura, após o pré-tratamento, após a hidrólise enzimática, no licor e no hidrolisado enzimático.....	93
Tabela 21. Resultados médios dos nutrientes potássio, magnésio, cobre, zinco, manganês, cálcio, ferro, sódio, nitrogênio e fósforo no clone de cana energia IACBIO 1230 in natura, após o pré-	

tratamento, após a hidrólise enzimática, no licor e no hidrolisado enzimático.....	94
---------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado das fibras de materiais lignocelulósicos (LEE 1997).....	32
Figura 2. Quebra das ligações β -1,4 glicosídicas da celulose e obtenção da glicose (GRASEL et al, 2017).....	37
Figura 3. Estruturas dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (FENGEL e WEGENER, 1989).	38
Figura 4. Estrutura esquemática da lignina (KIRK e FARRELL, 1987).	39
Figura 5. Produtos de degradação da celulose, hemicelulose e lignina (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000).....	44
Figura 6. Fluxograma da via de obtenção de xilitol e etanol a partir de xilose (JACKSON e NICOLSON, 2002).	48
Figura 7. Processo de destoxificação do hidrolisado da fração hemicelulósica do material (A- Adição de CaO e Centrifugação, B- Adição de ácido fosfórico e Centrifugação, C- Adição de carvão ativado e filtração).....	59
Figura 8. Metalização das amostras com ouro paládio através do equipamento DESK II - DENTON VACUM (A). Visualização microscópica das amostras através do equipamento JOEL-JSM5410 (B).	64
Figura 9. Resultado do desdobramento de brotamentos ao longo da fermentação do licor. Letras maiúsculas para mostos DMS = 15,82; Letras minúsculas para tempos de amostragem DMS = 15,20.	74
Figura 10. Resultado do desdobramento de brotamentos ao longo da fermentação do licor. Letras maiúsculas para mostos DMS = 8,92; Letras minúsculas para tempos de amostragem DMS = 9,92.	75
Figura 11. Resultado do desdobramento de Viabilidade de Brotos ao longo da fermentação do licor. Letras maiúsculas para mostos DMS = 30,94; Letras minúsculas para tempos de amostragem DMS = 31,50.	76

Figura 12. Representação da assimilação média de glicose de quatro materiais ao longo de 32 horas de fermentação.	76
Figura 13. Representação da assimilação médio de xilose de quatro materiais ao longo de 32 horas de fermentação.	77
Figura 14. Representação da produção média de ácido acético ao longo de 32 horas de fermentação.....	78
Figura 15. Representação da produção média de etanol ao longo de 32 horas de fermentação.	79
Figura 16. Resultados do cálculo de rendimento da fermentação do licor (%) das biomassas estudadas.	80
Figura 17. Representação gráfica da atividade da enzima celuclast 1.5L.....	82
Figura 18. Representação gráfica dos resultados médios de obtenção de glicose ao longo de 72 horas de hidrólise enzimática.	83
Figura 19. Resultados do cálculo de Rendimento da hidrólise enzimática (%) para as biomassas estudadas.	85
Figura 20. Poder calorífico superior e inferior (Kcal/Kg) das biomassas estudadas in natura, após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática.....	95
Figura 21. Análise de microscopia eletrônica de varredura RB855453 (palha) in natura (A – aumento de 150x; B – aumento 1000x).	96
Figura 22. Análise de microscopia eletrônica de varredura RB855453 (palha) pré-tratada (A – aumento de 150x; B – aumento 1000x).	96
Figura 23. Análise de microscopia eletrônica de varredura RB855453 (palha) após hidrólise enzimática (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).	96
Figura 24. Análise de microscopia eletrônica de varredura SP87-365 (palha) in natura (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).....	97
Figura 25. Análise de microscopia eletrônica de varredura SP87-365 (palha) pré-tratada (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).	97

Figura 26. Análise de microscopia eletrônica de varredura SP87-365 (palha) após hidrólise enzimática (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).	97
Figura 27. Análise de microscopia eletrônica de varredura CTC 4 (palha) in natura (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).	98
Figura 28. Análise de microscopia eletrônica de varredura CTC 4 (palha) pré-tratada (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).	98
Figura 29. Análise de microscopia eletrônica de varredura CTC 4 (palha) após hidrólise enzimática (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).	98
Figura 30. Análise de microscopia eletrônica de varredura bagaço de cana da in natura (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).	99
Figura 31. Análise de microscopia eletrônica de varredura bagaço de cana pré-tratado (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).	99
Figura 32. Análise de microscopia eletrônica de varredura bagaço de cana após hidrólise enzimática (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).	99
Figura 33. Análise de microscopia eletrônica de varredura IACBIO 1249 (cana energia) in natura (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).	100
Figura 34. Análise de microscopia eletrônica de varredura IACBIO 1249 (cana energia) pré-tratada (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).	100
Figura 35. Análise de microscopia eletrônica de varredura IACBIO 1249 (cana energia) após hidrólise enzimática (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).	100
Figura 36. Análise de microscopia eletrônica de varredura IACBIO 1230 (cana energia) in natura (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).	101
Figura 37. Análise de microscopia eletrônica de varredura IACBIO 1230 (cana energia) pré-tratada (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).	101

Figura 38. Análise de microscopia eletrônica de varredura IACBIO 1230 (cana energia) pré-tratada (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).	101
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

BIOMASSA DERIVADA DE CANA-DE-AÇÚCAR E CANA ENERGIA SUBMETIDAS A HIDRÓLISE ÁCIDA E ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

RESUMO – A produção de etanol no Brasil é desenvolvida principalmente através do caldo e melaço de cana-de-açúcar. Considerando-se o aumento da demanda por combustíveis, a biomassa lignocelulósica surge como alternativa pois é o recurso biológico renovável mais abundante da terra. A produção de cana-de-açúcar gera diversos resíduos, como a palhada, deixada no campo após a colheita mecanizada, e o bagaço, que é separado do caldo na operação de moagem dos colmos de cana, e atualmente existem programas de melhoramento genético que visam o desenvolvimento de variedades com altos teores de lignina, para o uso na geração de energia elétrica. Essa biomassa lignocelulósica é composta por cerca de 70% de polímeros de açúcar, materiais que têm grande potencial para a produção de etanol. Este estudo foi realizado objetivando o uso da palhada, bagaço e clones de cana energia, através de pré-tratamento e hidrólise, avaliando seus potenciais para a produção de etanol. Utilizou-se 6 amostras de biomassa: a palhada de três variedades de cana-de-açúcar, coletadas em épocas diferentes; bagaço de cana; e dois clones de cana energia. Estes materiais foram caracterizados com relação a composição de celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas e, logo após, passaram por pré-tratamento ácido, do qual foi obtido um licor, que foi concentrado e destoxificado, para o uso no processo fermentativo. Utilizou-se a estirpe de levedura *Rhodotorula glutinis* que apresenta habilidade de assimilar xilose. Foram realizadas fermentações, em três repetições, avaliando-se a viabilidade celular, viabilidade de brotos e brotamentos das células. Avaliou-se também o consumo de xilose e produção de etanol. Foram analisadas quantidade de nutrientes minerais em todas as etapas desta pesquisa. Foi realizada a hidrólise enzimática da celulignina e avaliado a composição do hidrolisado. Das biomassas secas, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura e poder calorífico inferior e superior. Observou-se que a palhada, bagaço de cana-de-açúcar e os clones de cana energia apresentam características diferentes com relação a sua composição e após o pré-tratamento, há redução em torno de 90% nos teores de hemicelulose. A

viabilidade celular, brotamentos e viabilidade de brotos tiveram uma redução, em relação à viabilidade do inóculo, de cerca de 40%, o que pode ter sido afetado por compostos contaminantes produzidos durante o pré-tratamento ácido. O processo fermentativo também foi influenciado negativamente sendo o rendimento da fermentação da xilose em torno de 20% para cana energia e o menor resultado observado a partir do bagaço de cana (em torno de 4%), indicando a possibilidade da produção de maiores quantidades de Etanol. Na hidrólise enzimática, foram liberadas quantidades de glicose sendo os maiores rendimentos para a palhada das três diferentes variedades de cana, em torno de 30%. Os nutrientes reduziram significativamente das biomassas in natura, para a biomassa pré-tratada. Parte dos nutrientes foram solubilizados no pré-tratamento, o que pode ser observado na análise do licor. O hidrolisado apresentou quantidade reduzida de nutrientes, indicando que para uma fermentação eficiente é necessário que haja suplementação de açúcares e nutrientes. Houve aumento em torno de 500 a 1000kcal/Kg para os tratamentos com relação ao poder calorífico dos materiais in natura para os materiais após a hidrólise enzimática.

Palavras chave: Hemicelulose, Xilose, Energia renovável.

**BIOMASS DERIVED FROM SUGARCANE AND CANE ENERGY
SUBMITTED TO ACID AND ENZYMATIC HYDROLYSIS FOR ETHANOL
PRODUCTION**

ABSTRACT - Ethanol production in Brazil is mainly developed through sugarcane juice and molasses. Considering the increased demand for fuels, lignocellulosic biomass appears as an alternative because it is the most abundant renewable biological resource on earth. Sugar cane production generates various residues, such as straw, left in the field after mechanized harvesting, and bagasse, which is separated from the broth in the milling operation of sugarcane fields, and there are currently breeding programs that aim at the development of varieties with high lignin contents, for use in the generation of electric energy. This lignocellulosic biomass is composed of about 70% of sugar polymers, which materials have great potential for the production of ethanol. This study was carried out with the objective of using straw, bagasse and sugar cane clones, through pre-treatment and hydrolysis, evaluating its potential for ethanol production. Six biomass samples were used: the straw of three sugarcane varieties, collected at different times; sugarcane bagasse; And two sugar cane clones. These materials were characterized with respect to the composition of cellulose, hemicellulose, lignin, extractives and ashes and, thereafter, underwent acid pretreatment, from which a liquor was obtained, which was concentrated and detoxified, for use in the fermentation process. The yeast strain *Rhodotorula glutinis* was used which has the ability to assimilate xylose. Fermentations were performed in three replicates, evaluating the cell viability, viability of shoots and shoots of the cells. The consumption of xylose and ethanol production were also evaluated. The amount of mineral nutrients at all stages of this research was analyzed. The enzymatic hydrolysis of cellulignin was performed and the composition of the hydrolyzate was evaluated. From the dried biomass, analyzes of scanning electron microscopy and lower and upper calorific power were performed. It was observed that straw, sugarcane bagasse and sugar cane clones have different characteristics in relation to their composition and after pretreatment, there is a reduction of about 90% in hemicellulose contents. Cell viability, sprouts and viability of shoots had a reduction in inoculum viability of about 40%, which may have been affected by contaminant compounds produced during acid pretreatment. The fermentation

process was also negatively influenced by the yield of the xylose fermentation around 20% for cane energy and the lowest result observed from the sugarcane bagasse (around 4%), indicating the possibility of producing larger amounts of Ethanol. In the enzymatic hydrolysis, amounts of glucose were released, being the highest yields for the straw of the three different sugarcane varieties, around 30%. The nutrients reduced significantly of the in natura biomasses, for the pretreated biomass. Some of the nutrients were solubilized in the pretreatment, which can be observed in the analysis of the liquor. The hydrolyzate presented reduced amount of nutrients, indicating that for an efficient fermentation it is necessary to have sugars and nutrients supplementation. There was an increase of about 500 to 1000 kcal/kg for the treatments with respect to the calorific value of the in natura materials for the materials after the enzymatic hydrolysis.

Key words: Hemicellulose, Xylose, Renewable energy.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as fontes de energia conhecidas, o etanol destaca-se como energia renovável, reduzindo as emissões de gases de efeito estufa no ambiente através da absorção do CO₂ atmosférico que ocorre durante a produção da biomassa no campo.

Na colheita e processamento industrial da cana-de-açúcar para a fabricação de açúcar e etanol, diversos resíduos são gerados, como por exemplo o bagaço e a palhada. Antes vistos como problema para as indústrias, agora são tratados como co-produtos, podendo ser utilizados na otimização do processo de produção.

O bagaço de cana-de-açúcar in natura é definido como resíduo dos colmos da cana-de-açúcar, resultado da extração máxima do conteúdo celular rico em açúcares solúveis. Atualmente é queimado em caldeiras gerando energia, muitas vezes, em quantidade maior que a necessária na usina, sendo então passível de comercialização. Além disso, esta é a matéria-prima mais comum utilizada em pesquisas de etanol de segunda geração, devido a grande quantidade e fácil disponibilidade.

As pontas e palhas (folhas verdes e secas) são materiais residuais resultantes do sistema de colheita “Cana Crua” (sem queima) ou mecanizada. Estudos referentes ao aproveitamento da ponta e palha começaram a ter destaque recentemente, junto ao aumento do sistema de colheita mecanizada que deixa no campo cerca de 10 a 20 ton/ha⁻¹ de palhada no campo (ALONSO *et al.*, 2010).

Sobre o aproveitamento da palhada são apresentadas discussões quanto aos efeitos benéficos e prejudiciais desta biomassa ao ser deixada no campo (MUÑOZ e QUINTERO, 2009); à forma de sua utilização na cogeração de energia, uma vez que esta apresenta composição e tamanho heterogêneo (em comparação ao bagaço), alta presença de cinzas e matérias contaminantes do solo (ALONSO *et al.*, 2010). E, além destes questionamentos, a possibilidade de utilização em processos de hidrólise e conversão microbiana (SALCEDO *et al.*, 2011; SILVA, 2009).

Alguns programas de melhoramento genético visam a produção de fibra, através de variedades de cana-de-açúcar mais rústicas, a este tipo de biomassa, se dá o nome de cana energia. Sua produção apresenta menores exigências em solos, clima, água e nutrientes e com resistência ao ataque de pragas e doenças, o que pode produzir mais energia, com menores gastos em produção resultando em mais energia produzida pela unidade de energia gasta (OKUNO, 2016).

A biomassa resultante do processamento de culturas agroindustriais e as matérias-primas energéticas, podem ser consideradas os recursos biológicos renováveis mais abundante da Terra, as quais podem ser utilizadas para a produção de etanol.

Diversas pesquisas estão sendo realizadas para o aproveitamento integral da biomassa vegetal na produção de biocombustíveis, energia renovável e produtos químicos que agreguem valor à matéria-prima (RABELO *et al.*, 2011).

A composição da biomassa vegetal é muito variável: celulose (35 – 50%), hemicelulose (20 – 35%) e lignina (10– 25%), dos quais a hemicelulose, e particularmente a glucoronoarabinoxilana (predominante na cana-de-açúcar), tem sido indicada como o polímero de maior facilidade de degradação por sua estrutura amorfa (SAHA, 2003).

Este material pode ser utilizado na produção do etanol de segunda geração, cujo processo consiste, primeiramente, no pré-tratamento da matéria-prima, disponibilizando os açúcares constituintes de suas frações celulósicas e hemicelulósicas representados principalmente pela glicose e xilose respectivamente.

Realiza-se então a hidrólise (ácida/ enzimática), seguida da destoxificação da fração hidrolisada para redução do teor de inibidores provenientes da etapa de hidrólise. A utilização de licores provenientes da quebra da hemicelulose, no processo fermentativo, requer a disponibilidade de microrganismos fermentadores de pentoses, em particular a xilose que se apresenta em maior quantidade nesta fração.

O desempenho da fermentação depende de vários fatores como a composição e condição do meio em que está inserida, quantidade de nutrientes no caldo e a atuação das leveduras, estes são essenciais para

os processos metabólicos, pois, qualquer contaminante que compete pelos nutrientes, interfere de maneira negativa, ocasionando menor eficiência e menor rendimento alcoólico.

Neste contexto deve-se destacar que a realização de estudos que contribuam para o desenvolvimento e/ou consolidação do emprego de resíduos agroindustriais na produção de biocombustíveis, tem relevada importância para o desenvolvimento econômico e sustentável do planeta.

O presente estudo objetivou o uso de bagaço de cana, palhada e cana energia na produção de etanol de segunda geração a partir de pré-tratamento ácido, destoxificação e fermentação do licor utilizando-se leveduras fermentadoras de pentoses, além da hidrólise enzimática. Avaliou-se a composição do licor e do hidrolisado com relação aos açúcares e nutrientes, além da análise em microscopia eletrônica para a visualização das biomassas após os tratamentos realizados, verificando-se a viabilidade de utilização dessas matérias-primas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Considerando-se que a população mundial ultrapassa 7 bilhões de habitantes, faz-se necessário um avanço biotecnológico para que haja água, alimentos e energia, acessível para todos, com boa qualidade e que sejam produzidos de maneira sustentável.

A busca por fontes de energia alternativas, que sejam de origem renovável, com menores impactos ao meio ambiente e para sociedade tem aumentado ano-a-ano. Os biocombustíveis destacam-se, apresentando dentre as vantagens, a produção da matéria-prima que pode ser adequada de acordo com oferta/procura, possibilitando a competitividade na cadeia produtiva em relação aos derivados do petróleo (SILVA NETTO e LEAL, 2012).

O termo biocombustível refere-se a combustíveis líquidos ou gasosos com utilizados no setor de transporte e produzidos de biomassa. Dentre os principais combustíveis produzidos a partir destes recursos naturais, pode-se destacar o bioetanol (FERREIRA, 2015). O bioetanol é um composto orgânico oxigenado, produzido por fermentação, através da conversão dos açúcares contidos no caldo de cana (principal substrato utilizado no Brasil) por ação das leveduras liberando gás carbônico e energia.

Na safra 2016/2017, a produção de bioetanol deve se manter acima de 27,5 bilhões de litros (CONAB, 2016). De acordo com dados do Sindicato Nacional da Indústria de Componentes para Veículos Automotores, em 2015, os veículos flex representaram mais da metade da frota total dos automotores circulantes.

A produção de bioetanol tende a aumentar a medida em que os países aderirem às normas e protocolos a fim de diminuir a emissão de gases de efeito estufa. O setor produtivo deverá evoluir mediante o desenvolvimento de tecnologias, especialmente para o melhor uso de biomassas (SILVA NETTO e LEAL, 2012).

Em geral, as biomassas apresentam uma estrutura complexa e compacta sendo necessário submeter esta biomassa à pré-tratamento físico e/ou químico antes da sua hidrólise para produção de etanol. Esta

etapa é responsável pela remoção de lignina e hemicelulose, redução de cristalinidade da celulose e aumento da porosidade do material, a tornar a celulose suscetível à hidrólise (ESPIRITO SANTO, 2014).

Para a produção economicamente viável do etanol de segunda geração a partir de biomassa, consistem em variação da composição das diversas matérias-primas que podem ser utilizadas, bem como as informações sobre a melhor opção de pré-tratamentos e hidrólise ,disponibilizar a glicose , termos de custo global, rendimento de açúcares fermentescíveis e fermentação (SILVA, *et al.*, 2010)

2.1 Matérias-primas para produção de etanol

A produção de etanol pelo processo fermentativo é realizada através do desdobramento de substrato rico em açúcares que são convertidos por ação de leveduras. Os substratos podem ser constituídos por qualquer produto que contenha carboidratos como fonte de carbono, por exemplo, a sacarose, glicose, celulose, amido, dentre outros, utilizados como matéria-prima (SANTOS, 2013).

Para escolha da matéria-prima alguns fatores devem ser considerados, como custo de produção, rendimentos, disponibilidade no local e custo de transporte, facilidade de recuperação do produto. Após a definição e a escolha da matéria-prima (Tabela 1), são necessárias adaptações para utilização industrial.

Em relação ao custo do substrato alguns fatores também devem ser considerados tais como: quantidade de carbono disponível; suprimento do substrato; disponibilidade; variedade na composição da matéria-prima; condições de armazenamento; dificuldade de esterilização do mosto; fermentescibilidade; exigência de tratamentos para tornar o substrato presente na matéria prima; comportamento do mosto durante e após a fermentação (COSTA *et al*, 2014).

Tabela 1. Composição e características das matérias-primas a serem utilizadas para produção de etanol.

Matérias primas	Processos produtivos	Características
<p>Matérias açucaradas: cana de açúcar, melaço, beterraba açucareira, sorgo sacarino, melaços, mel de abelha e frutas.</p>	Fermentação	<p>Diretamente fermentescíveis: as que contem monossacarídeos limitam-se aos sucos de frutas. Ex: Produção de álcool em bebidas como o vinho.</p> <p>Não diretamente fermentescíveis: são as que contem dissacarídeo, fermentam após uma hidrólise (inversão), realizadas naturalmente pelo agente de fermentação. Ex: sacarose o mais importante componente da cana-de-açúcar e dos melaços.</p>
<p>Matérias amiláceas e feculentas: grãos amiláceos, raízes e tubérculos feculentos exs. milho, mandioca, batata doce, trigo.</p>	Amidos: hidrólise e fermentação	<p>São matérias que fermentam após uma hidrólise, denominada sacarificação. A produção de etanol de cereais é pouco usada em escala industrial no Brasil pelo custo de produção, com maior importância para indústria de bebidas.</p>
<p>Matérias celulósicas: incluindo palhas, madeiras, resíduos agrícolas e resíduos sulfíticos de fábricas de papel.</p>	Lignocelulósicos : hidrólise, purificação e fermentação	<p>É a maior massa de matéria-prima. Porém apresenta inúmeras dificuldades até o momento para o processo para sacarificar a celulose, devido a sua complexidade e custo.</p>
<p>Matérias-primas fermentadas: bebidas fermentadas</p>	Destilação para elevação do teor alcoólico	<p>Pode ser utilizada em casos extremos, em que se faz necessário a destilação de produtos que já foram fermentados.</p>

Fonte: Lima, Basso e Amorim (2001).

A produção de etanol é realizada em três fases, preparo do substrato (mosto), fermentação e destilação. O mosto ou meio de fermentação deve propiciar o desenvolvimento microbiano, favorecendo produção de etanol. Este deve conter os elementos essenciais na proporção correta, favorecendo a realização das reações fisiológicas pelos microrganismos e conseqüentemente a eficiência e rendimento do processo (LIMA *et al.*, 2001).

No Brasil a cana-de-açúcar é a matéria-prima mais utilizada para produção de etanol. A literatura destaca ainda a utilização do milho nos Estados Unidos, beterraba e trigo na Europa, mandioca na Tailândia além de aparecerem em menor frequência o arroz, centeio, cevada, milheto, batata, batata doce, além do sorgo sacarino (MASSON *et al.*, 2015).

Concomitantemente a essas matérias-primas, a biomassa lignocelulósica apresenta-se como matéria-prima para a produção do “etanol do futuro”, principalmente por seu baixo custo e abundância (Rabelo *et al.*, 2011). Sua utilização depende da otimização da disponibilização dos açúcares contidos no substrato, adaptação dos microrganismos, composição do meio, além de recuperação do produto (LIMA *et al.*, 2001).

2.2 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma gramínea, semi-perene, suscetível às mudanças climáticas anuais. É cultivada no Brasil desde século XVI, sendo, portanto de grande importância econômica, destacando-se na produção açúcar, etanol, cachaça e energia, e no contexto social, é responsável pela geração de empregos diretos e indiretos (UDOP, 2016).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, principal matéria-prima para a indústria sucroenergética. O bagaço que sobra após a extração do caldo, do qual são produzidos o açúcar e o etanol, seu aproveitamento industrial é vasto sendo que já no início do século passado, começou a ser utilizado como combustível substituto à lenha para a

geração de calor e energia para a própria usina e em parte comercializada por concessionárias de energia elétrica (SOUZA; AZEVEDO, 2006).

A produção de cana-de-açúcar, na safra 2016/17, terá acréscimo de 4,4% em relação à safra passada. Em números absolutos se estima uma produção de 694,5 mil toneladas de cana-de-açúcar, ante às 665,6 mil toneladas na safra 2015/16. Nesta safra, a estimativa é de aumento na produção de anidro, passando de 11,2 bilhões de litros para 11,4 bilhões de litros (CONAB, 2016).

Com a colheita mecanizada sem a queima prévia da cana-de-açúcar, mantém-se sobre a superfície do solo uma quantidade considerável de resíduos vegetais, como palha e ponteiros de cana que variam entre 10 a 30 t ha⁻¹ (FARONI *et al.* 2003). Estes materiais, juntamente com o bagaço, e as variedades de cana geneticamente modificados com a finalidade de produção de maiores teores de fibra, são compostos basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, deve incrementar tanto a cogeração de energia, como a produção de etanol lignocelulósico.

2.3 Biomassa lignocelulosica

Os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose (cerca de 70% da massa seca). Outra macromolécula constituída de álcoois aromáticos, a lignina, liga-se a esse polímero por ligações covalentes e de hidrogênio (Figura 1) (LEE, 1997). Em menores proporções, e dependendo da origem do vegetal, também podem ser encontrados ácidos graxos, fenóis, taninos, compostos nitrogenados e sais minerais, principalmente, de cálcio, potássio e magnésio (NEUREITER *et al.*, 2002).

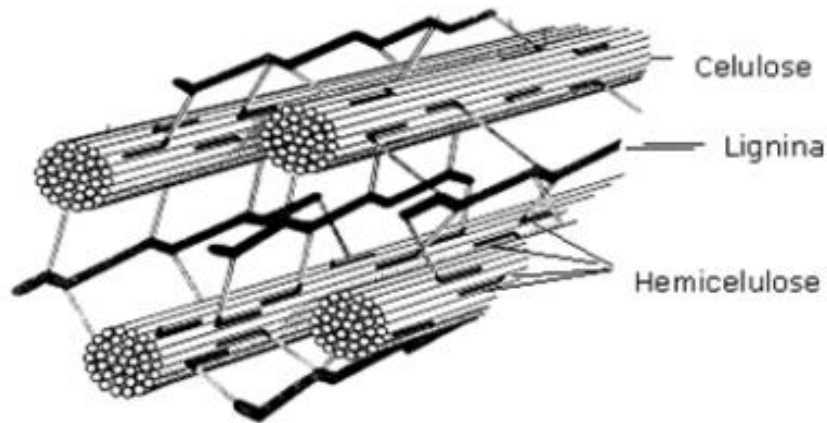


Figura 1. Esquema simplificado das fibras de materiais lignocelulósicos (LEE 1997).

Nos materiais in natura utilizados atualmente em pesquisas para a produção de etanol de segunda geração, há várias substâncias químicas como terpenos/terpenóides, gorduras/ceras, diversos tipos de compostos fenólicos, proteínas e cinzas os quais podem ser extraídos usando solvente polares e apolares. Estes componentes variam em cada espécie de material lignocelulósico, representando aproximadamente de 5 a 20% (FENGEL e WEGENER, 1989). A presença desses compostos pode levar a uma inibição do processo fermentativo, uma vez que esses podem ser tóxicos às leveduras.

Dentre as biomassas disponíveis, a biomassa residual apresenta diversas vantagens, como: não competição com a produção de alimentos, e além disso, custo reduzido de obtenção, já que é proveniente de processo pré-existente (Gaudereto, *et al*, 2017)

2.3.1 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar, é o resíduo da cana, que é separado do caldo na operação de moagem dos colmos de cana. Após o término do processo de moagem, o bagaço apresenta cerca de 30% da massa da cana e umidade por volta de 50%. A composição química do bagaço pode mudar de acordo com fatores como o tipo de cana, o tipo de solo e as técnicas de colheita (MORAIS *et al*, 2007).

O uso do bagaço como matéria prima apresenta uma série de vantagens: já vem processado das moendas; está disponível em grandes

quantidades; tem baixo custo; está pronto para o uso no local, evitando aumento de custo devido ao transporte (OLIVÉRIO e HILST, 2005). Além disso, a produção de etanol de segunda geração apresenta como grande vantagem a possibilidade de integração com o processo de primeira geração.

Em geral, o processamento de uma tonelada de cana-de-açúcar gera cerca de 280 Kg de bagaço. Segundo alguns autores, a utilização do bagaço excedente viabilizaria economicamente o investimento necessário para adaptar as usinas de açúcar e álcool, resolvendo o problema de abastecimento da indústria sucroalcooleira, oferecendo vantagens sócio-ambientais e aumentando o rendimento econômico do processo (GÁMEZ *et al.*, 2006).

O bagaço da cana-de-açúcar é a fração de biomassa resultante após os procedimentos de limpeza, preparo (redução através de jogos de facas rotativas niveladoras e desfibramento através de jogos de martelos oscilantes) e extração do caldo de cana (através de ternos de moagem ou de difusores). Segundo Medeiros (1992) o bagaço de cana-de-açúcar in natura é o resíduo dos colmos da cana-de-açúcar, decorrente da extração conteúdo celular rico em açúcares solúveis.

O bagaço não é considerado uma biomassa homogênea, pois pode apresentar variações em sua composição e na sua estrutura morfológica, em função dos procedimentos de corte no campo e no processamento industrial. Portanto, este material pode conter fragmentos grosseiros da parede celular e conteúdo celular não extraído na moagem da cana-de-açúcar (MORAIS *et al.*, 2007).

Seu componente principal é representado pelo açúcar não extraído durante o processo de moagem, aproximadamente 2 a 3%, e alto teor de componentes da parede celular (carboidratos estruturais), em torno de 70 a 85%, dos quais a celulose é o principal (44 a 50%), seguida da hemicelulose (24 a 30%) e da lignina (10 a 20%) (GERON *et al.*, 2010).

Para sua utilização como fonte celulósica, um dos desafios é a quebra do polímero de celulose e hemicelulose, em monômeros de interesse (SHEN e WYMAN, 2012).

2.3.2 Palhada de cana-de-açúcar

A palhada ou palhiço é composto pelas folhas secas, folhas verdes e pelo ponteiro da cana-de-açúcar, com grande potencial de geração de produtos com alto valor agregado, uma vez que cerca de 30% da energia total da planta está contida neste material (ALMEIDA, 2008).

A palha é composta pelas folhas (lâmina foliar e bainha) verdes e parcialmente secas (folhas mortas) e pelos ponteiros de cana formados pelos entrenós imaturos do topo “palmito” e folhas novas enroladas ao redor do meristema apical. Esse material permanece sobre a superfície do talhão após a colheita mecanizada, e pode conter ainda frações de colmos (industrializáveis ou não); eventualmente, frações de raízes e partículas de terra (RIPOLI e RIPOLI, 2007).

A palha de cana apresenta-se como longas folhas, dificultando sua compactação. Na maioria dos casos é necessário picá-la anteriormente, o que resulta em menor custo energético, além de se obter um produto mais homogêneo. É deixada na lavoura atuando como cobertura e proteção de solo. Difere do bagaço quanto ao menor conteúdo de lignina, maior teor de cinzas e baixa umidade (TEODORO *et al.*, 2011, SANTOS *et al.*, 2012)

Atualmente, este material não é totalmente aproveitado, o que deve mudar nos próximos anos, levando-se em conta que a legislação ambiental prevê a extinção gradativa da prática de colheita manual com o uso da despalha a fogo, o que aumentará a quantidade deste material no campo, fazendo com que novas tecnologias de recolhimento sejam desenvolvidas (SILVA *et al.*, 2010).

Algumas alternativas de manejo de palhadas estão descritas abaixo:

1 – Ventiladores da colhedora ligados: a palhada é deixada no campo, depois é enfardada e transportada até a usina para ser posteriormente utilização;

2 – Ventiladores da colhedora desligados: a palhada é transportada junto com a cana e a separação entre eles ocorre em uma Estação de Limpeza a Seco instalada na usina;

3 – O sistema de limpeza secundário da colhedora está desligado e o sistema primário trabalha em uma velocidade reduzida: ocorre uma

limpeza parcial da cana, deixando uma camada pouco densa no chão, e a palhada que vai junto com a cana é separada em uma Estação de Limpeza a Seco instalada na usina (SILVA *et al*, 2010).

De acordo com Santos *et al.*, (2012), a composição da palhada pode variar entre 40-44% de celulose, 30-32% de hemicelulose e 22-25% de lignina, no entanto, Roviero *et al.* (2015) observaram valores de celulose, hemicelulose e lignina em torno de 37,32, 35,98 e 5,52 respectivamente. Essa composição deve variar em função da variedade de cana-de-açúcar, época de colheita e condições edafoclimáticas.

2.3.3 Cana energia

Atualmente alguns programas de melhoramento genético priorizam a produção de fibra em variedades de cana-de-açúcar, que têm como resultado canas mais rústicas, menos exigentes em solos, clima, água e nutrientes e mais resistentes ao ataque de pragas e doenças, resultando em mais energia produzida pela unidade de energia gasta (OKUNO, 2016). A produção de híbridos da espécie *Saccharum spp.*, direcionada para a produção exclusiva de biomassa, denomina-se cana energia.

Grupos de pesquisa de melhoramento genético de cana-de-açúcar, estudam a seleção de plantas chamadas de cana-energia, ou seja, plantas de maior produtividade. Esses clones têm retornado ao banco de germoplasma ativo para fazerem parte do programa de seleção recorrente para maior produção de biomassa com menores teores de sacarose (MATSUOKA *et al*, 2010).

A cana-energia pode oferecer grandes oportunidades para o Brasil aumentar sua competitividade no ramo de energia renovável de biomassa, com benefícios à sociedade brasileira (MATSUOKA *et al*, 2010).

Acredita-se que a cana energia possa ser cultivada em áreas marginais à produção de alimentos, devido a sua rusticidade, se tornando um elemento estratégico para a produção de energia em regiões com difícil acesso à rede nacional de energia elétrica.

Em função da alta produtividade relatada e conseqüentemente de geração de energia, é razoável presumir que a atividade tenha boa

atratividade econômica para novos investimentos, como por exemplo, a produção de etanol lignocelulósico.

2.4 Estrutura e ultraestrutura da parede celular vegetal

A estrutura da parede celular vegetal é subdividida em paredes primária, secundária e terciária. Essas três camadas são compostas predominantemente por celulose com espessura da ordem de 5µm. As células são separadas pela lamela média, que é uma camada fina (máximo 1µm de espessura), composta por elevada concentração de lignina (MOITINHO *et al*, 2017).

A celulose e a hemicelulose predominam na região da parede celular enquanto a lignina se distribui por toda a estrutura, apresentando máxima concentração na lamela média. A distribuição da celulose, hemicelulose e lignina variam consideravelmente entre essas camadas (FENGEL e WEGENER, 1989).

A hemicelulose liga-se através de ligações de hidrogênio às microfibrilas da celulose, formando uma rede que fornece a espinha dorsal estrutural da parede celular da planta. A presença da lignina em algumas paredes celulares fornece força adicional e resistência às pragas e doenças (FENGEL e WEGENER, 1989).

2.4.1 Celulose (homopolímero)

A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n é um polímero de cadeia longa composto de um só monômero (glicose), classificado como polissacarídeo ou carboidrato. É um dos principais constituintes das paredes celulares das plantas, em combinação com a lignina, com hemicelulose e pectina (NISHIYAMA, *et al.*, 2002).

A celulose, principal componente da biomassa, é o polímero mais abundante da Terra. Este é formado por uma cadeia linear de moléculas de glicose ligadas entre si na posição beta-1,4. Essas ligações contêm energia livre que podem ser quebradas liberando açúcares fermentáveis (BUCKERIDGE *et al*, 2008).

A quantidade de celulose presente na cana, assim como o conteúdo de fibras varia de acordo com as diferentes localidades de cultivo, variedades utilizadas, condições de crescimento e condições fisiológicas (CASAGRANDE, 1991). No processo industrial, esta fica praticamente toda retida no bagaço e bagacilhos, sendo pouca quantidade extraída junto ao caldo (DELGADO e CESAR, 1977).

Para a disponibilização das moléculas de glicose contidas na celulose (Figura 3), são utilizadas diversas tecnologias, sendo a hidrólise ácida e enzimática as mais estudadas, as quais apresentam vantagens e desvantagens (GRASEL *et al*, 2017).

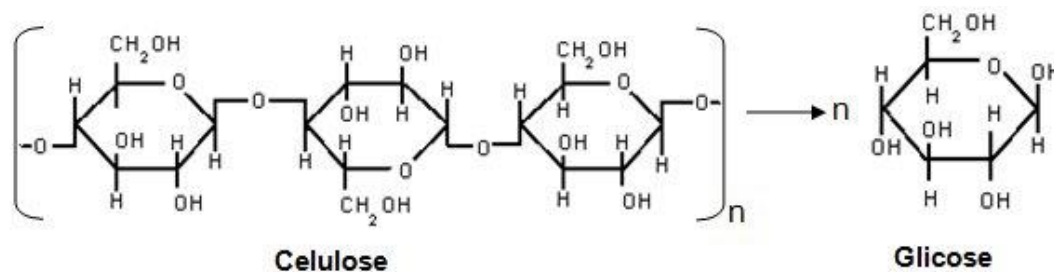


Figura 2. Quebra das ligações β -1,4 glicosídicas da celulose e obtenção da glicose (GRASEL *et al*, 2017).

2.4.2 Hemicelulose (heteropolímero)

As hemiceluloses ou polioses estão intimamente associadas à celulose e são compostas por diferentes unidades de açúcares formando cadeias ramificadas (FENGEL e WEGENER, 1989) (Figura 3).

Estas diferentes unidades de açúcares são compostas por glicose, manose e galactose (hexoses) além da xilose e arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses (CANETTIERE, 2004).

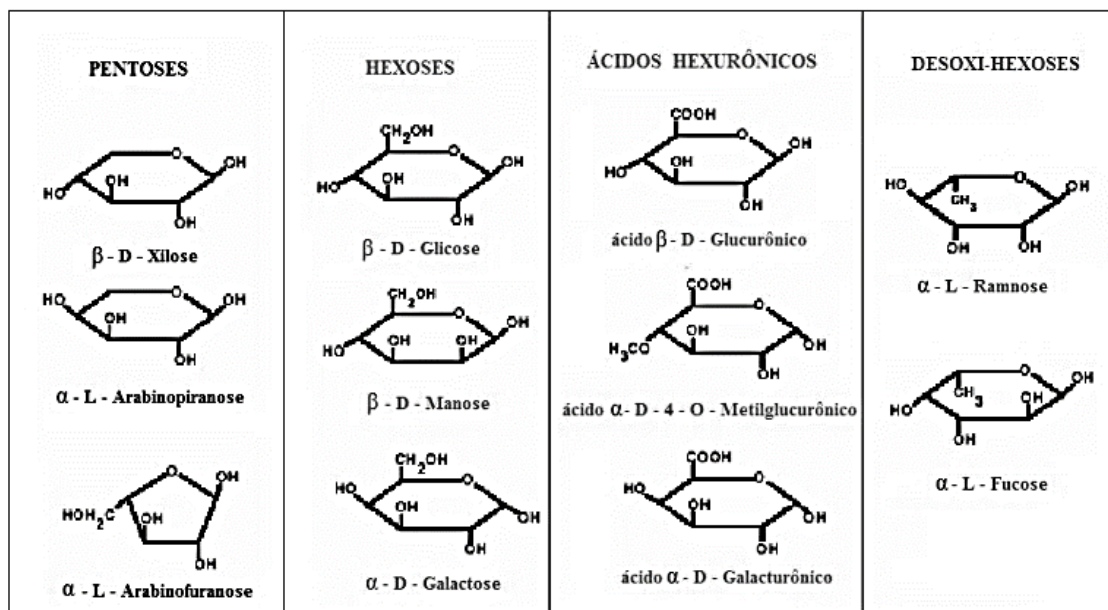


Figura 3. Estruturas dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (FENGEL e WEGENER, 1989).

Entre seis e oito moléculas de celulose ocorre o alinhamento paralelo formando uma fibra, em que são liberadas moléculas de água, constituindo uma microfibrila longa e resistente. Sobre a superfície destas, aderem-se as hemiceluloses que são polímeros heterogêneos classificados de acordo com os monossacarídeos existentes, que cobrem a celulose desenvolvendo o chamado domínio celulose-hemicelulose que constituem a parede celular.

A hemicelulose evita que as moléculas de celulose de fibras paralelas interajam e permitem a ligação fraca entre uma fibra e outra, formando uma rede (BUCKERIDGE *et al*, 2008). A hemicelulose é constituída por aproximadamente 92,5% de xilose, 3,7% de arabinose e 4,96% de glucurânio, além de outros componentes, variando de acordo com a matéria-prima.

Na cana-de-açúcar ela apresenta-se em 5,49% do total de compostos da folha, 3,04% do colmo, 7,04% da raiz, 26,26% da panícula e, ainda, 22-30% do bagaço resultante do processamento industrial (HONIG, 1969).

2.4.3 Lignina

A lignina é importante para as plantas em vários aspectos, como o desenvolvimento vegetal, contribuição para a resistência mecânica e proteção contra degradação (WALKER, 1975). É uma substância que se incorpora no crescimento do vegetal, sendo sua composição baseada em unidades fenil-propano formando uma macromolécula tridimensional e amorfa.

A lignina é uma macromolécula fenólica, formada pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (TEIXEIRA *et al*, 2017).

Quando ocorre a redução do controle enzimático durante a formação da lignina, ocorre uma série aleatória de ligações, o que a torna estrutura muito complexa (JUNG e FAHEY, 1983). A estrutura da lignina é mostrada na Figura 4.

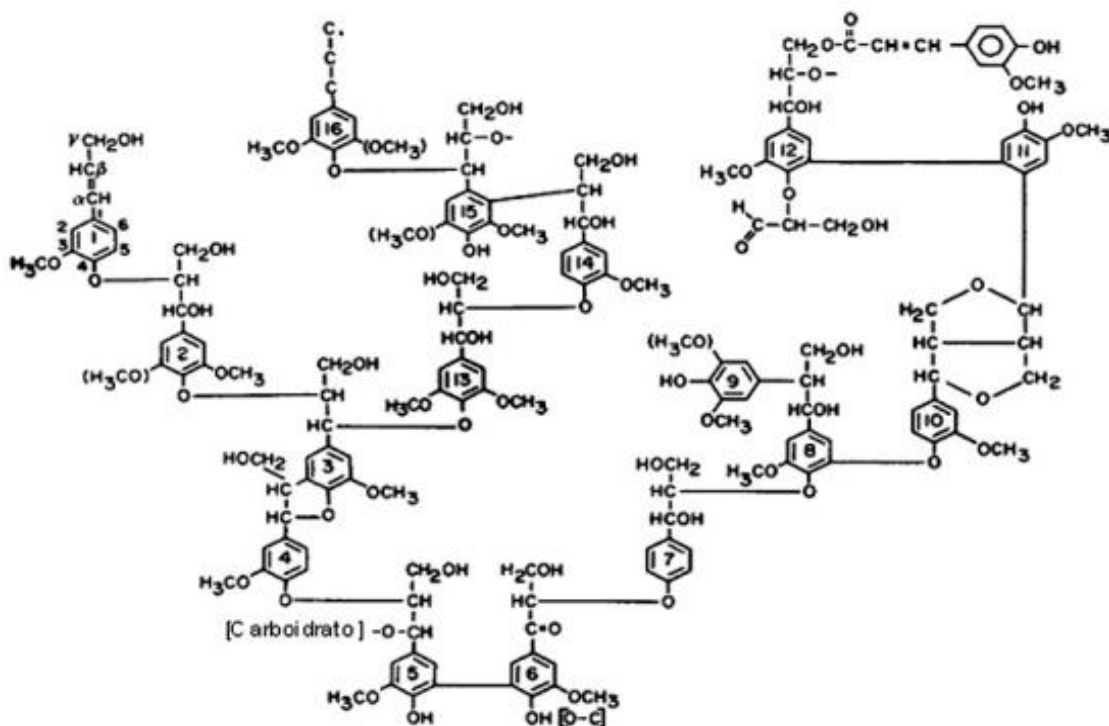


Figura 4. Estrutura esquemática da lignina (KIRK e FARRELL, 1987).

A lignina dificulta o uso do bagaço para produzir etanol, impedindo as reações químicas que liberam os açúcares da parede celular para a fermentação. Sua decomposição química pode gerar compostos fenólicos

como o ácido 4 hidroxibenzóico, vanilina, catecol e siringaldeído que devem interferir negativamente no processo fermentativo (MUSSATO e ROBERTO, 2004, PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000).

2.4.4 Extrativos

Os extrativos são constituídos por uma grande variabilidade de componentes químicos, que representam uma pequena porcentagem da massa seca dos materiais vegetais. Esses compostos são formados por inúmeros componentes individuais de natureza hidrofílica ou lipofílica (SJÖSTRÖM, 1993). Esses compostos estão concentrados nos canais resiníferos e nas células de parênquima (FENGEL e WEGENER, 1989).

Os extrativos, como graxas, gomas, amidos, alcalóides, resinas e óleos essenciais, podem representar acima de 5% da massa total, sendo constituídos por uma grande variedade de compostos orgânicos podendo ser extraídos com solventes orgânicos ou aquosos (FENGEL e WEGENER, 1989).

Basicamente, os extrativos podem ser classificados, segundo sua composição química, em terpenos e terpenoides, graxas e gorduras (compostos alifáticos), e compostos fenólicos. Os extrativos juntamente com os componentes fenólicos são capazes de inibir os micrororganismos que realizam o processo fermentativo (RANATUNGA *et al.*, 1997).

2.4.5 Cinzas totais

A quantidade de cinzas depende da região e como foi coletada a palha de cana. A palha localizada próxima ao solo apresenta concentração de cinzas em torno de 7 a 8%. Já a palha proveniente do meio da cana e as folhas verdes apresentam quantidade de cinzas em torno de 2 a 3%. Segundo Almeida (2008) teores elevados de cinzas na palha da cana-de-açúcar podem ser decorrentes do manuseio da palha durante a colheita e o transporte, sendo esse outro possível fator que pode contribuir para a obtenção de valores divergentes de cinzas.

Altos teores de cinzas interferem na eficiência de processos realizados na palha para a sua utilização como fonte energética

(PITARELO, 2007). Concentrações elevadas de cinzas podem diminuir o potencial energético da matéria-prima para o processo de fermentação, acarretando aumento no efeito tampão da matéria-prima, podendo ocorrer a neutralização parcial dos catalisadores ácidos responsáveis pela hidrólise parcial dos polissacarídeos constituintes da biomassa, além de causar maior abrasão e corrosão dos equipamentos.

2.5 Pré-tratamentos

Para se melhorar a eficiência do processo de hidrólise é necessário a realização de pré-tratamento para facilitar a disponibilização dos açúcares da matéria-prima para a produção de etanol. Considerando-se que os materiais lignocelulósicos têm sua composição organizada de forma muito complexa, seu pré-tratamento também não é simples (TAHERZADEH e KARIMI, 2008).

Vários métodos de pré-tratamento têm sido propostos na literatura para separação e aproveitamento de materiais lignocelulósicos. Os pré-tratamentos são divididos em quatro grupos: I – Pré-tratamento físico, II – Pré-tratamento físico-químico, III – Pré-tratamento químico e IV – Pré-tratamento biológico (TAHERZADEH E KARIMI, 2008).

Considera-se um pré-tratamento adequado quando é possível evitar a necessidade de reduzir o tamanho das partículas, preservando as pentoses provindas da hemicelulose, com liberação de produtos de degradação reduzida, como ácidos e compostos fenólicos, a fim de evitar a inibição do crescimento dos microrganismos fermentativos e sendo este processo realizado da forma mais econômica possível (MEIGHAN, 2016).

O resultado do pré-tratamento deve ser balanceado contra seu impacto no custo das etapas dos processos posteriores, operacional, capital e biomassa (MEIGHAN, 2016).

Na Tabela 2 estão diversos exemplos de técnicas estudadas.

Tabela 2. Tipos de pré-tratamentos utilizados para a deslignificação da matéria-prima.

Explosão ou craqueamento	Explosão a vapor Explosão por CO ² Explosão com SO ²		
Alcalino	Hidróxido de sódio Amônia Sulfito de amônia	São os métodos que apresentam melhores resultados com maiores possibilidades de utilização industrial Tratamento rápido com necessidade de condições severas Uso de reagentes químicos	Deslignificação Redução da cristalinidade da celulose Redução do grau de polimerização Hidrólise parcial ou completa da hemicelulose Aumento da área superficial para hidrólise
Ácido	Ácido Sulfúrico Ácido Clorídrico Ácido fosfórico		
Gás	Dióxido de cloro Dióxido de nitrogênio Dióxido de Enxofre		
Agentes Oxidantes	Peróxido de hidrogênio Oxidação úmida Ozônio		
Extração de lignina por solventes	Benzeno-água Etanol-água Etilenoglicol Butanol-água Agentes de inchaço		
Moagem	Moagem por bolas Moagem com martelo Moagem coloidal Moagem vibratória Moagem por compressão	Alta demanda de energia Não removem a lignina completamente Sem uso de reagentes químicos	
Irradiação	Raio gama Feixe de elétrons Microondas		
Outros	Hidrotérmica Vapor à alta pressão Expansão Extrusão Pirólise		

Fonte: Taherzadeh e Karimi, 2008.

2.5.1 Pré-tratamento com ácido diluído

Processos de pré-tratamento com ácido diluído (0,5%/H₂SO₄) são promissoras tecnologias para produção de etanol. Uma das grandes vantagens deste processo é uma corrosão menor dos equipamentos em relação ao processo com ácido concentrado (CORRÊA, 2016).

No pré-tratamento com ácido diluído o material é misturado a uma solução de ácido diluído numa relação de 0,5 a 3% da biomassa seca e submetido a temperaturas de 120° até 200°C por tempo da ordem de 10 a 30 minutos (ASSUMPÇÃO, 2016).

A conversão da hemicelulose é eficiente (cerca de 90%) e conduz a uma alta recuperação dos carboidratos monoméricos. A biomassa tratada apresenta melhor digestibilidade ácida ou enzimática (CORRÊA, 2016).

A desvantagem deste tratamento está associada à necessidade de um pós-tratamento de neutralização da acidez. Outra desvantagem é a formação de produtos de degradação dos açúcares como o furfural (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000; SOARES e ROSSEL, 2004).

Após o pré-tratamento com ácido diluído, tem-se como resultado a celulignina, que é o material sólido, no qual se procederá o processo de hidrólise através de enzimas, em que se obtém a glicose, provinda da quebra da celulose, que pode ser fermentada para a produção do bioetanol (ASSUMPÇÃO, 2016).

Além disso, é obtido um licor, o qual é rico em carboidratos, provindos da quebra da hemicelulose, sendo os principais, a xilose, a arabinose e a glicose. A xilose e arabinose podem, assim como a glicose, serem fermentadas, produzindo etanol, no entanto, essas pentoses, requerem o uso de microrganismos que as fermentem, já que a *Sacharomyces cerevisiae* não o faz (ASSUMPÇÃO, 2016).

Embora as composições dos açúcares resultantes dependam do método de pré-tratamento/hidrólise e das circunstâncias empregadas, os constituintes principais dos hidrolisados são a glicose e xilose liberados da celulose e hemicelulose, respectivamente (CORRÊA, 2016).

2.5.2 Compostos inibidores da fermentação gerados no pré-tratamento

No processo de hidrólise ácida, pode ocorrer a formação de alguns subprodutos (Figura 5) que interferem negativamente no processo de fermentação, como ácido acético, que é formado pela hidrólise do grupo acetil presente na hemicelulose; ácidos fórmicos e levulínicos, produtos da degradação do açúcar; compostos fenólicos, formados principalmente pela degradação parcial da lignina; e furaldeídos ou aldeídos furanos, principalmente furfural e 5-hidroximetilfurfural, formados pela degradação de pentoses e hexoses (MARTIN *et al.*, 2007).

De acordo com Martin e Jonsson, (2003), a maioria das leveduras, inclusive as estirpes industriais, são suscetíveis a vários compostos inibidores derivados da hidrólise ácida e especialmente suscetíveis à presença de múltiplos inibidores podendo ocasionar perdas no rendimento em etano de 10 a 25%.

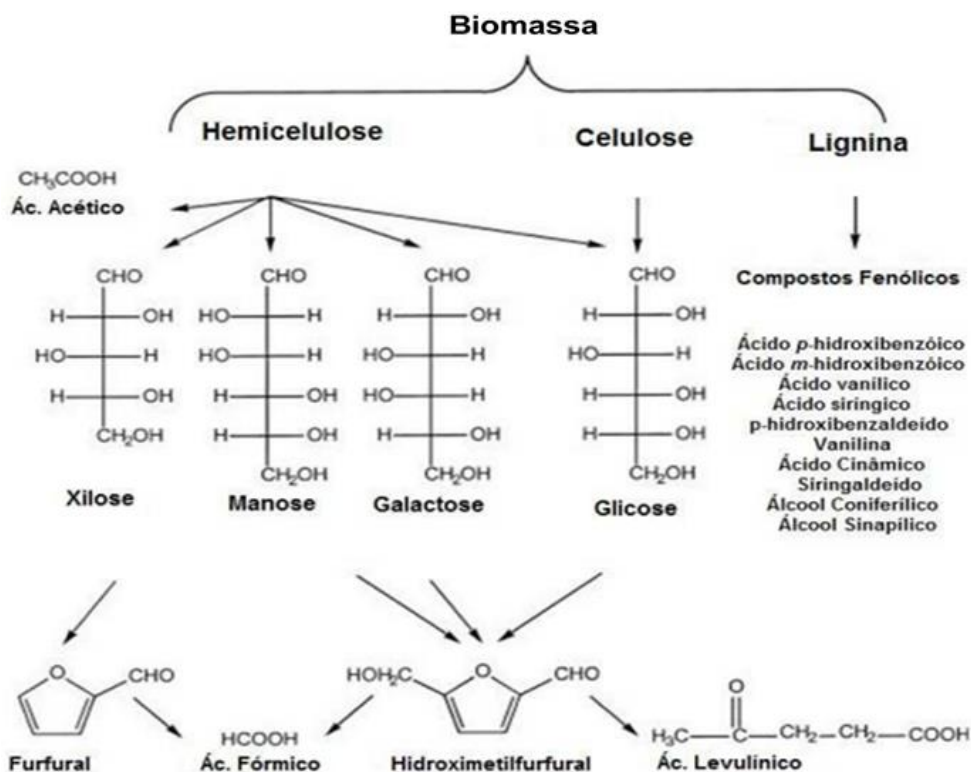


Figura 5. Produtos de degradação da celulose, hemicelulose e lignina (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000).

A presença de ácidos orgânicos no meio fermentativo resulta em aumento no consumo de ATP pela levedura. Nessas condições, parte do ATP que seria utilizado para crescimento ou fermentação é desviado para manutenção de seu pH interno (NARENDRANATH *et al.*, 2001).

Os compostos fenólicos podem inibir a bioconversão de açúcares a etanol, inibindo a atividade enzimática, destruindo a integridade da membrana e afetando as suas propriedades, como a barreira seletiva (HEIPIEPER *et al.*, 1994).

Os furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) são compostos que afetam os microrganismos, pois reduzem suas atividades enzimáticas e biológicas, quebram o DNA e inibem a síntese de RNA e proteínas (MODING *et al.*, 2002).

Vários métodos têm sido estudados e utilizados para remover os compostos tóxicos hidrolisado hemicelulósico, objetivando o aumento na eficiência fermentativa. Dentre as técnicas de destoxificação pode-se destacar: a alteração de pH por ácidos e bases e adsorção de carvão ativo (MARTON, 2002; MUSSATO e ROBERTO, 2004), a adsorção de resinas de troca iônica (SILVA, 2006) e biodestoxificação (FONSECA, 2009).

Alterações de pH do licor através do processo de destoxificação podem modificar as concentrações de açúcares, nutrientes e dos compostos tóxicos. A adsorção do carvão ativo após o ajuste de pH, tem a função de clarear ou filtrar, para que esta reação ocorra deve se ter a carbonização e a ativação (AHMEDNA *et al.*, 2000).

2.6 Leveduras fermentadoras

As leveduras são os microrganismos responsáveis pela conversão de açúcares a etanol através dos processos fermentativos tanto de cana-de-açúcar. As linhagens utilizadas na indústria pertencem ao gênero *Saccharomyces* que foram selecionadas ao longo de vários anos. Apresentam elevada eficiência no desdobramento de sacarose, glicose e frutose presentes no mosto, estando extremamente adaptadas aos processos fermentativos em cana-de-açúcar (BASSO *et al.*, 1993).

A glicose obtida da hidrólise da celulose pode facilmente ser fermentada por microrganismos existentes como é feito atualmente. Entretanto, na hidrólise da fração hemicelulósica são extraídas hexoses, facilmente fermentadas, e pentoses, conhecidos como açúcares infermentescíveis. Conseqüentemente, as tecnologias de fermentação que utilizam as pentoses necessitam ser bem desenvolvidas para realçar a eficiência total do processo da conversão (LEE, 1997).

Microrganismos que metabolizam as pentoses vêm sendo isolados e modificados geneticamente, no entanto o rendimento em etanol ainda não é suficiente para tornar o processo economicamente atrativo. Diversos produtos de degradação, como o ácido fórmico, acético, furfural, hidroximetilfurfural e fenóis, produzidos durante o pré-tratamento e a hidrólise, podem inibir o processo de fermentação e afetar rendimentos do etanol, devendo assim ser removidos ou suavizados (PALMQVIST E HAHN-HAGERDAL, 2000).

Segundo Chandel *et al.*, (2007), ao analisar os custos do processo de hidrólise, deve ser levado em consideração os compostos que inibem o crescimento dos microrganismos, formados pela hidrólise do material em questão, podendo afetar a viabilidade celular e a viabilidade de brotos inviabilizando o processo de reciclo de células no processo fermentativo.

2.6.1 Rhodotorula glutinis

O microrganismo da espécie *Rhodotorula glutinis* classifica-se taxonomicamente no reino Fungi, no filo Basidiomycota, na classe Microbotryomycetes, na ordem Sporidiobolales e no gênero *Rhodotorula*, sendo que sua família ainda não lhe foi atribuída (ANDRADE, 2010).

O gênero *Rhodotorula* é conhecido por sua capacidade de biossintetizar carotenoides, tais como β -caroteno, toruleno e torularrodina, em diferentes proporções. Há estudos que visam o uso de glicerol como fonte de carbono na produção de pigmentos carotenoides por linhagens do gênero *Rhodotorula* através de fermentação submersa (CASTELO BRANCO, 2015).

Estudos demonstraram que essa levedura pode se desenvolver em meios de composições diversas, como em meios onde a fonte de carbono é a xilose e/ou glucose (DAI *et al*, 2007) sendo os principais componentes da hidrólise de materiais lenhocelulósicos.

Babau *et al*, (2013), em seus estudos, evidenciaram que a levedura *Rhodotorula glutinis* é capaz de consumir simultaneamente glicose e xilose. A taxa de crescimento e rendimento de conversão do carbono em relação à biomassa pode diminuir dependendo da mistura da composição da xilose / glucose.

Esta estirpe foi utilizada em experimento de Fugita, 2010, que a comparou com a estirpe *Candida guilliermondii*, que já é largamente utilizada na conversão de xilose a xilitol, na produção de etanol. Como resultados, se observou maior produção de etanol pela *Rhodotorula glutinis* quando comparada com *Candida guilliermondii*.

2.6.2 Metabolismo de glicose, xilose e arabinose para produção de etanol

Na fermentação, os microrganismos produzem duas moléculas de ATP, e no processo de respiração tem-se 38 ATPs, em que ocorre a formação da biomassa celular (LEHNINGER *et al*, 2000). A levedura sendo um microrganismo facultativo realiza estas duas vias metabólicas de acordo com as concentrações de açúcares no meio fermentativo que influenciam o processo (FUGITA, 2010).

A utilização de xilose por leveduras é possível graças à capacidade que alguns destes microrganismos apresentam de metabolizar a xilose (Figura 6).

Em materiais lignocelulósicos o principal açúcar presente no licor hemicelulósico é a xilose, sendo assim sua conversão se dará pelo metabolismo xilulolítico, dependendo do microrganismo a ser utilizado, levando a produção de etanol e xilitol (ARRUDA, 2007).

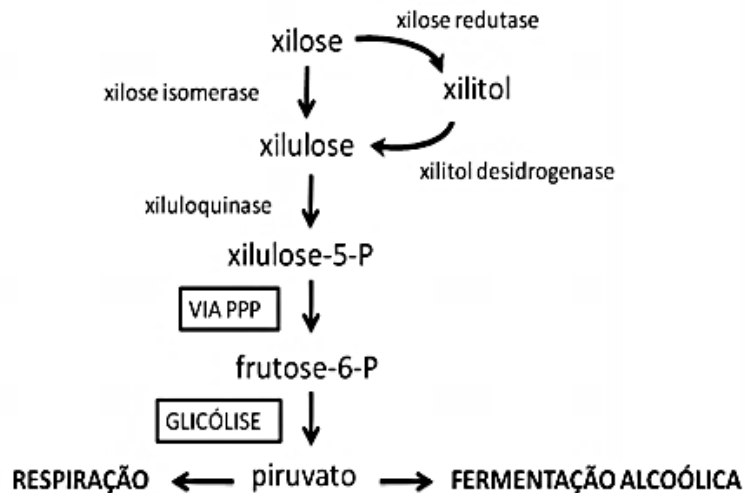


Figura 6. Fluxograma da via de obtenção de xilitol e etanol a partir de xilose (JACKSON e NICOLSON, 2002).

O processo de conversão de D-xilose a D-xilulose ocorre em duas etapas. Primeiro sob ação da enzima xilose redutase ocorre a redução de D-xilose a D-xilitol, posteriormente sob ação da enzima xilitol desidrogenase, D-xilitol é oxidado a D-xilulose, esta é fosforilada a D-xilulose-5P pela xilulose quinase (PITKÄNEN *et al.*, 2003).

A D-xilulose-5P é convertida a gliceraldeído-3P e frutose-6P, entrando na via da glicólise, sendo levada até formação do piruvato o qual pode ser oxidado pelo Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos, recuperando as coenzimas através da cadeia respiratória ou ser fermentado a etanol, pela ação das enzimas piruvato descarboxilase e etanol desidrogenase, sendo neste processo, reoxidado o NADH resultantes da oxidação de gliceraldeído 3P (HAN- HAGERDAL *et al.*, 2007).

Para produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, após a redução de compostos tóxicos (destoxificação) e adequação das características químico tecnológicas faz-se necessária para o preparo do mosto. Neste caso deve-se utilizar ainda microrganismos que apresentem habilidade de converter pentoses e hexoses a etanol (CHENG *et al.*, 2008).

Segundo Walker (1998), existe alguns contrastes na fermentação industrial de pentoses a etanol, tais como a baixa tolerância ao etanol por leveduras fermentadoras de pentose. Também, a presença de glicose nos

hidrolisados hemicelulósicos pode atuar como repressora dos genes responsáveis pela utilização da xilose.

2.7 Hidrólise enzimática

Considerando-se sua heterogeneidade da biomassa, a sacarificação enzimática depende de várias atividades específicas para que o carboidrato nela disponível seja hidrolisado (LORENCINI, 2013).

De acordo com Eklund *et al.* (1990) apud Rabelo, (2007), o processo enzimático pode ser dividido em duas etapas, na primeira a biomassa lignocelulósica é pré-tratada para aumentar a acessibilidade ao ataque enzimático. Na segunda etapa, a hidrólise propriamente dita, a celulose é quebrada através das enzimas celulase.

O processo de hidrólise enzimática demonstra algumas vantagens em relação aos processos com ácido, dentre elas, a realização de hidrólise em temperaturas baixas (em torno de 40 - 50°C), e a baixa formação de subprodutos de degradação se destacam, no entanto, as enzimas utilizadas representam um alto custo, e são consideradas como uma questão chave no desenvolvimento deste processo em escala industrial (LORENCINI, 2013).

Ainda há estudos sobre recuperação e reciclo das enzimas a partir do hidrolisado da celulose e o desenvolvimento da síntese destas enzimas (batelada alimentada ou fermentação sólida), ou até a produção das enzimas no mesmo reator onde ocorre a hidrólise (RABELO, 2007) o que influenciaria na redução de custos viabilizando o uso de enzimas.

Após a hidrólise enzimática, têm-se a glicose como principal componente do hidrolisado, neste sentido, é necessário a avaliação da composição de outros compostos, como quantidade de produtos inibidores da fermentação e também quantidade de nutrientes, assim, o processo fermentativo pode ocorrer sem grandes dificuldades (LORENCINI, 2013).

2.8 Nutrientes na fermentação

Os elementos químicos são indispensáveis para o desenvolvimento vegetal, pois sem eles, as plantas não conseguem completar seu ciclo de

vida. As plantas obtêm os nutrientes que necessitam por meio da absorção pelas raízes dos elementos existentes no solo (RAIJ, 2011).

No seu desenvolvimento, o sistema radicular entra em contato com os nutrientes que podem ser absorvidos por interceptação radicular, fluxo de massa ou difusão (RAIJ, 2011).

Para a cana-de-açúcar o nitrogênio é necessário em grandes quantidades e o seu fornecimento ajuda a maximizar a produção de massa seca e produtividade. Maiores quantidades de nitrogênio são necessárias durante o perfilhamento e máximo crescimento. O fósforo é exigido no início de desenvolvimento das plantas para assegurar um adequado crescimento de raízes e para impulsionar perfilhamento. O potássio é necessário em grandes quantidades, a maioria do potássio é alocado nos colmos e o pico de demanda ocorre durante a fase de máximo crescimento quando a extração é mais rápida do que em qualquer outro nutriente (RAIJ *et al.*, 1996).

Uma quantidade significativa de cálcio é extraída no início de desenvolvimento da cultura, sendo importante no enraizamento e integridade de células. O magnésio é extraído gradualmente em estágios mais tardios de crescimento, a maior parte fica alocada nos colmos e são importantes para a qualidade da cana (RAIJ *et al.*, 1996).

Embora os níveis de micronutrientes necessários para o crescimento das plantas sejam muito menores, eles desempenham funções importantes no seu crescimento. Os micronutrientes extraídos em maiores quantidades são ferro e manganês, assegurando o crescimento livre de estresse, melhorando a performance fotossintética e a produtividade da cana (RAIJ *et al.*, 1996).

Os níveis de ferro nas plantas variam significativamente dependendo do suprimento do solo e deficiências são raras. A maior parte do ferro é encontrado na palha e nos ponteiros. O zinco embora seja necessário em menores quantidades, possui funções específicas no desenvolvimento de novos tecidos vegetais (RAIJ *et al.*, 1996).

Após o desenvolvimento e maturação da planta, ocorre a colheita, em que grande parte das folhas verdes e secas ficam no solo contribuindo com a reciclagem de nutrientes que serão utilizados pela planta na próxima

safra. Na indústria, o caldo é separado do bagaço, parte dos nutrientes é extraída juntamente com o caldo, e parte fica retida no bagaço que é utilizado na co-geração de energia.

As leveduras são agentes biológicos e para metabolizarem o substrato, precisam de quantidades de nutrientes suficientes. Suas células exigem íons inorgânicos (minerais) para que possam se multiplicar e apresentarem rendimentos fermentativos satisfatórios. A falta de nutrientes presentes no meio de fermentação provoca alterações metabólicas significativas (AMORIM *et al*, 1996).

Dentre os principais substratos exigidos pela levedura estão os açúcares e o nitrogênio, mas o desenvolvimento das suas atividades metabólicas ela necessita de outros elementos, como o fósforo, potássio, cobre, enxofre, magnésio e zinco, que são vitais para a célula (AMORIM., 2005).

O nitrogênio é um elemento essencial para o crescimento e para uma fermentação com bons rendimentos. Quando há a falta deste nutriente, pode haver aumento do tempo de fermentação, além da redução do rendimento. Caso haja quantidades elevadas, a levedura vai se multiplicar, desviando o açúcar para a produção de biomassa. Stuppiello e Hori, (1981) indicam que a quantidade ideal de nitrogênio assimilável na fermentação é de 300 a 350 ppm de N total no mosto.

O fósforo possui grande importância para a levedura com relação ao crescimento e metabolismo de carboidratos (STUPIELLO e HORI, 1981) pois este participa diretamente nos processos de transformação e transferência de energia química, integrando moléculas informacionais (DNA, RNA) e estrutura a das membranas celulares. Sua composição no mosto pode variar muito, dependendo da quantidade deste elemento disponível no solo para que a planta possa absorver. A complementação pode ser realizada para que a recomendação de 125 a 150 ppm de P_2O_5 seja atendida (AMORIM, 2005).

O enxofre é requerido em baixa quantidade no mosto já que acima do nível ideal pode haver o aumento da produção de glicerol e inibição do desenvolvimento das leveduras (AMORIM, 2005).

O potássio possui a função de estabilizar as membranas e agir como ativador enzimático, além de controlar o pH interno da célula e influenciar na absorção de fósforo e zinco. A quantidade ideal deste composto, varia de 700 a 1000 mg/L no mosto. Além disso, outros minerais atuam como ativadores enzimáticos à multiplicação e a fermentação, destacando-se dentre eles o magnésio, cerca de 100 a 200 mg/L, que atua em mais de duzentas reações enzimáticas, o zinco, cobre, manganês necessários em torno de 1 a 5 mg/L e outros minerais que afetam a viabilidade, a multiplicação de células e o rendimento (AMORIM, 2005).

As concentrações de nutrientes encontradas apresentam uma relação direta com a variedade estudada, o tipo de solo e adubação, dentre outros fatores.

2.9 Co-geração de energia elétrica

A co-geração constitui-se na geração simultânea de energia térmica e mecânica, a partir de um mesmo combustível (gás natural, resíduos de madeira, casca de arroz, bagaço de cana, palha, etc.). A energia mecânica obtida pode ser utilizada na forma de trabalho ou transformada em eletricidade, através de geradores. Já a energia térmica pode ser utilizada como fonte de calor em um processo industrial, ou no setor de comércio / serviços.

O potencial de geração de energia elétrica pelo setor sucroalcooleiro está relacionado diretamente à tecnologia empregada, devido ao fato de que os custos unitários (R\$/kW instalado) serem influenciados pelo efeito escala. O tipo de caldeira utilizada para a queima (caldeiras de pressão mais elevada – 40 a 100 bar), bem como a utilização de turbinas de múltiplo estágio, podem elevar, de forma significativa, a eficiência energética do processo.

A geração de energia elétrica por parte do setor sucroalcooleiro se encontra abaixo do seu potencial. Segundo Souza e Azevedo (2006), *“mediante a adoção de tecnologias disponíveis de co-geração a partir do bagaço e da palha, apenas a produção de excedente de energia por parte*

das usinas paulistas seria capaz de suprir o déficit de toda a região Sudeste, por ocasião do racionamento, durante a crise de 2001-2002”.

O poder calorífico é a quantidade de energia na forma de calor liberada pela combustão de uma unidade de massa do material combustível. A quantidade de energia nas biomassas é quantificada pela unidade do poder calorífico (kcal/kg) (ROCCO, 2011).

O Poder Calorífico Superior (PCS) é aquele que considera o calor de vaporização da água, mais precisamente, o PCS compreende a soma da energia liberada por uma unidade de massa seca a 0% de umidade, na forma de calor, e a energia, na forma de calor latente de vaporização, da água de constituição que é recuperada. Quando se desconta o calor de vaporização da água, obtém-se o Poder Calorífico Inferior (PCI) (ROCCO, 2011).

2.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para verificar visualmente os tratamentos utilizados ao longo deste experimento foi utilizada a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) sendo esta uma técnica muito utilizada e que contribui muito em vários campos da ciência, sendo cada vez mais utilizado em materiais celulósicos. O microscópio eletrônico é um instrumento de alta resolução e com capacidade de ampliação em até 300.000x (CHIROMITO, 2016).

O MEV utiliza um feixe fino de elétrons que quando emitidos, interagem com a superfície das amostras resultando em uma série de radiações, como elétrons secundários, elétrons retro espalhados e raios-X característicos. Estas radiações são captadas e convertidas em imagens que exibem as características morfológicas da amostra (ASSUMPÇÃO, 2016).

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada na análise morfológica do bagaço de cana de açúcar, após os pré-tratamentos ácidos e alcalinos (ASSUMPÇÃO, 2016). A morfologia dos grânulos pode ser observada através de MEV, sendo possível observar as alterações estruturais que a extrusão provoca nas fibras lignocelulósicas das biomassas (MORO, 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi conduzida no Laboratório de Tecnologia do Açúcar e Álcool e Microbiologia das Fermentações do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal – São Paulo, no CTBE - Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, Campinas – São Paulo e na EEL – Escola de Engenharia de Lorena, USP – Lorena – São Paulo.

3.1. Obtenção da matéria-prima

Utilizou-se palhada resultante de colheita mecanizada, de diferentes cultivares, além da coleta de bagaço de cana-de-açúcar, e 2 variedades de cana energia ambos cedidos por unidade industrial e centro de pesquisa, na região de Jaboticabal, São Paulo.

Biomassa de cana e cana energia utilizadas:

- Palhada da variedade RB855453 (3º corte) coletada em 25/06/2014.
- Palhada da variedade SP87-365 (3º corte) coletada em 05/09/2014.
- Palhada da variedade CTC 4 (4º corte) coletada em 11/11/2014.
- Bagaço coletado em pátio de unidade de produção em 25/06/2014.
- Colmos inteiros triturados do clone IACBIO 1249 Cana Energia coletada em 07/07/2015.
- Colmos inteiros triturados do clone IACBIO 1230 Cana Energia coletada em 07/07/2015.

Depois de coletados, os materiais foram secos ao ar livre e logo após, armazenados em sacos de 100L.

3.1.1 Características das variedades estudadas

RB855453 - precocidade e riqueza, ótima soqueira colmos eretos, de difícil tombamento, diâmetro médio a grosso, com cor verde amarelado, mas levemente arroxeadada quando exposta ao sol.

SP87-365 - colheita no meio da safra, rica e produtiva. Exigente em solo e água, suscetível a broca e cigarrinha.

CTC 4 - perfilhamento alto, as folhas mais novas são eretas e as demais, arqueadas; Maturação média para final de safra.

Os clones de Cana energia estão sendo desenvolvidos pelo IAC (Instituto Agrônomo de Cana) podendo apresentar cerca de 50% a mais de biomassa que a cana convencional. As variedades são mais finas e apresentam grandes quantidades de perfilhos, têm grande adaptabilidade a solos fracos e ainda possuem um caldo que pode dar 90 quilos de ATR por tonelada de cana.

O melhor ambiente de produção, nutrição, resposta às pragas e doenças, longevidade e como colher essa cana estão sendo estudados pelos pesquisadores. A expectativa é que essas variedades sejam lançadas em breve.

3.2. Caracterização da matéria-prima

A caracterização foi realizada nos materiais in natura, após o pré-tratamento com ácido diluído e após a hidrólise enzimática. No material in natura seco, foram feitas as análises de extrativos, cinzas, lignina, celulose e hemicelulose. Já nos materiais após o pré-tratamento e após hidrólise enzimática, foram feitas as análises de cinzas, lignina, celulose e hemicelulose.

Para análise da composição química, a biomassa foi submetida à moimho de facas até a redução em partículas com tamanho inferior a 0,5 mm, selecionadas através de uma peneira de 20 mesh (SLUITER, 2016).

3.2.1 Determinação do teor de cinzas totais na biomassa

A determinação do teor de cinzas totais da biomassa foi baseada no procedimento padrão do NREL "Determination of Ash in Biomass" (SLUITER, 2016).

Em que cadinhos de porcelana de 50,0mL foram numerados e pesados em balança analítica tendo suas massas anotadas. Pesou-se

cerca de 0,5 g do material, descontando o teor de umidade, nos cadinhos previamente pesados. O material foi carbonizado na mufla em uma rampa de temperatura: aguardar a mufla atingir 105°C e cronometrar 12 minutos; aquecer até 250°C com uma taxa de 10°C/minuto e cronometrar 30 minutos; aquecer até 575°C e cronometrar 180 minutos. Após este período, a mufla foi desligada e esperou-se cerca de 2h até que o material resfriasse. Posteriormente, os cadinhos foram transferidos para um dessecador e efetuada a pesagem do material.

3.2.2 Determinação dos extrativos na biomassa

A determinação dos extrativos na biomassa foi baseado nos procedimentos padrões do NREL “Determination of Extractives in Biomass” (SLUITER, 2016) e na norma TAPPI T204 om-88 “Solvent Extractives of Wood and Pulp”.

Adicionou-se aproximadamente 2g da amostra, descontando o teor de umidade, ao cartucho de extração tendo sua massa devidamente anotada. Após montagem do extrator, o cartucho contendo biomassa foi introduzido no tubo de extração do soxhlet (SLUITER, 2016).

Adicionou-se 100,0mL de ciclohexano-etanol em cada balão do extrator juntamente com pérolas de vidro. Os balões foram colocados no extrator e o aquecimento ajustado para que fornecesse no mínimo 4-5 sifonações por hora. A extração ocorreu de 6 a 8 horas. Após extração com solvente, as amostras foram novamente submetidas a lavagem, utilizando aproximadamente 100mL de água destilada por pelo menos 24h. No final deste processo, os sólidos foram transferidos para uma estufa a 105°C até massa constante, determinada em balança analítica (SLUITER, 2016).

3.2.3 Determinação de carboidratos e lignina na biomassa

A quantificação de celulose e hemicelulose foi calculada pela obtenção dos resultados de carboidratos com base nos procedimentos padrões do NREL (SLUITER, 2016) a partir da hidrólise ácida concentrada em que se pesou aproximadamente 0,30 g de cada amostra de matéria seca, descontando-se o teor de umidade. Adicionou-se 3,0mL de ácido

sulfúrico a 72% (m/m) em cada becker devidamente identificado. Estes foram encubados em um banho termostático a 30°C por 1 hora. Utilizando-se um bastão de vidro, as amostras foram agitadas a cada 5-10 min sem serem removidas do banho (SLUITER, 2016).

Após a hidrólise ácida concentrada, os beckeres foram removidos do banho termostático e o conteúdo transferido quantitativamente para erlenmeyers de 250mL, utilizando para isso, 84,0mL de água destilada, sendo a concentração ácida do meio diluída para 4%. Para a completa hidrólise, os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e elásticos e colocados em uma autoclave. As amostras foram autoclavadas por 1 h a 121°C e 1,1 bar. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente antes de remover o papel alumínio (SLUITER, 2016).

As concentrações de açúcares foram determinadas mediante cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foi usado um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD (Kyoto, Japão), com um detector de índice de refração e coluna Bio Rad (Hercules, CA) Aminex HPX-87H, mantida a 45°C, com H₂SO₄ 0,01 N como eluente, e fluxo de 0,6mL/min. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro "Sep Pack" C18 (Millipore).

3.3 Condições de pré-tratamento

As umidades foram obtidas em determinador de umidade Sartorius MA35, e logo após foram feitos os cálculos para a realização do pré-tratamento.

Utilizou-se reator de aço inoxidável com capacidade de 500mL, com 30g de massa seca em estufa aerada a 60°C, em que se descontou os valores de umidade obtidos, e apresentavam grande heterogeneidade de tamanhos de fibra. A concentração de ácido sulfúrico foi de 0,5%, a temperatura utilizada foi de 140°C por 15 minutos, com 3 repetições (RABELO *et al.*, 2011).

A fração líquida, correspondente ao hidrolisado hemicelulósico dos materiais estudados foi separada do resíduo sólido (celulignina) através de uma membrana de éster de celulose com diâmetro de poro de 0,45µm, e

mantida em câmara fria (4°C) até posterior caracterização e futura utilização nos processos fermentativos. A celulignina foi lavada com água em abundância, depois seca em estufa a 60°C e armazenada para outros experimentos.

3.4 Concentração, destoxificação e preparo do mosto

Após a obtenção dos licores, cada amostra foi misturada com suas repetições correspondentes e encaminhados para o processo de concentração em rotaevaporador de simples efeito a 60°C com sistema de vácuo a 635mmHg, com a intenção de aumentar a quantidade de açúcares. Depois de concentrados, foi feita a destoxificação dos licores, para a remoção de compostos inibidores gerados no pré-tratamento, realizadas segundo metodologia descrita por Marton (2002).

O processo de concentração foi realizado de acordo com o volume total de licor obtido após a realização de três pré-tratamentos para cada biomassa utilizada (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados médios da composição obtidos após o pré tratamento ácido de Volume de licor, Peso de Celulignina e Umidade.

AMOSTRA	Volume de licor	Celulignina	Umidade
	mL	g	%
RB855453 palha	539	211	76,90
SP87-365 palha	510	229	73,77
CTC 4 palha	610	308	76,13
Bagaço	625	344	77,22
IACBIO 1249	630	350	76,25
IACBIO 1230	650	368	75,13

Para a destoxificação os pH dos licores concentrados foram ajustados para 7,0 pela adição de óxido de cálcio (CaO), seguido de redução até pH 4,0 utilizando ácido fosfórico (H₃PO₄). Após esta etapa, o hidrolisado foi submetido ao processo de adsorção empregando-se 1% (m/v) de carvão ativo (marca Synth) em incubadora a 50°C durante 30 min. Ao final de cada etapa de alteração de pH o hidrolisado foi centrifugado, recebendo a adição de carvão, e posteriormente filtrado (Figura 6). O

mosto foi preparado a partir dos licores destoxificados e concentrados adequando-se o pH para $4,0 \pm 0,5$, suplementado com 0,1g/L de Sulfato de Amônio e 0,1g/L de Fosfato de Potássio (FUGITA, 2010).

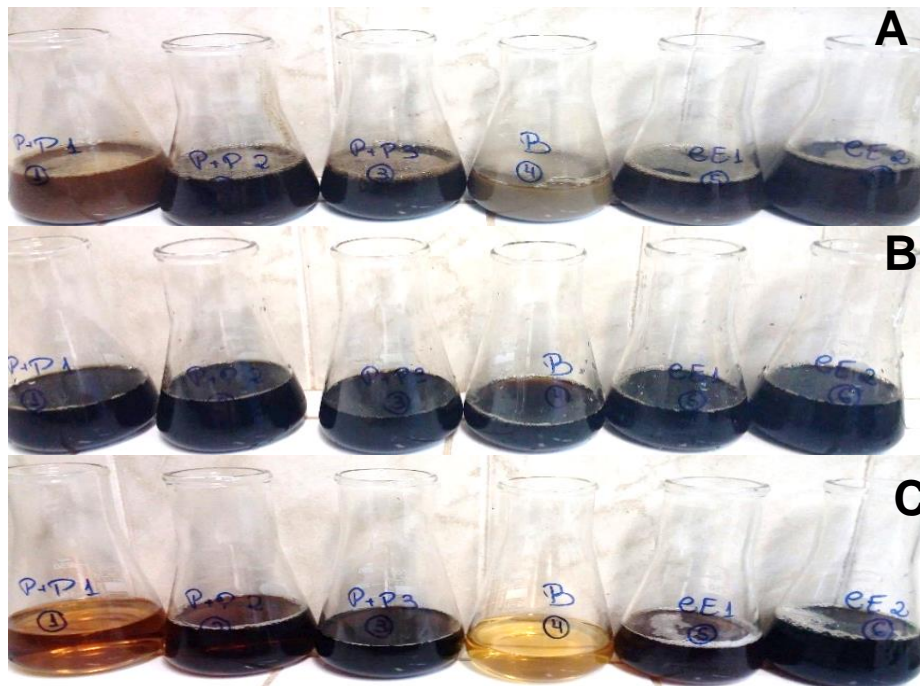


Figura 7. Processo de destoxificação do hidrolisado da fração hemicelulósica do material (A- Adição de CaO e Centrifugação, B- Adição de ácido fosfórico e Centrifugação, C- Adição de carvão ativado e filtração).

Foram retiradas alíquotas para análises em HPLC das quantidades de xilose, arabinose, glicose e ácido acético. Foram analisados o brix (teor de sólidos solúveis expressos em graus brix), através de leitura direta em refratômetro digital, o pH por leitura em peagômetro, acidez total titulada expressa em g/L H_2SO_4 segundo Copersucar, 2001, compostos fenólicos (g/L) de acordo com Folin e Ciocalteau (1927) e o teor de glicerol do vinho delevurado Copersucar (2001).

3.5 Reativação da levedura

Foi utilizada a linhagem de levedura J10 (*Rhodotorula glutinis*) obtida por cultura estoque, proveniente do banco de leveduras do Laboratório de Tecnologia do Açúcar e Etanol - Microbiologia das fermentações do

Departamento de Tecnologia da FCAV - UNESP, Jaboticabal – SP (GUIDI, 2000).

Para reativação, o inóculo mantido em óleo vegetal refrigerado, foi transferido assepticamente para tubo de ensaio contendo 5mL do meio GYMP conforme adaptação de Lodder (1970) mantido por 72h a 30°C (GUIDI 2000).

Em seguida foi realizado o crescimento do inóculo com o meio GYMP, sem a adição de ágar, durante 24 horas a 30°C até quantidade em massa suficiente para atingir 10^7 colônias, sendo utilizado 10% a partir do volume total da fermentação.

3.6 Condução da fermentação

A fermentação foi realizada em erlenmeyers de 100mL, contendo 50mL de mosto, com três repetições. Estas foram mantidas a 30°C em shaker a 200 rotações por minuto.

Foi determinada a viabilidade celular, a viabilidade de brotos e o índice de brotamentos, segundo Lee *et al.*, (1981), no inóculo, início (após 40 minutos da adição do mosto ao inóculo), 4, 12, 16 e 32 horas de fermentação.

Os cálculos foram realizados através das seguintes fórmulas:

Viabilidade celular % = $\frac{\text{células vivas} \times 100}{\text{células vivas} + \text{células mortas}}$.

Viabilidade de brotos % = $\frac{\text{brotos vivos} \times 100}{\text{brotos vivos} + \text{brotos mortos}}$.

Índice de brotamentos % = $\frac{\text{brotos vivos} \times 100}{\text{células vivas} + \text{células mortas}}$.

Foram retiradas amostras de cada uma das três repetições da fermentação, sendo em seguida compostas para a realização de análises em HPLC do consumo de açúcares e da produção de etanol.

3.6.1. Rendimento Fermentativo

O rendimento fermentativo foi obtido através dos teores de açúcares contidos no mosto e do teor de etanol no vinho (FERNANDES, 2000).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Álcool produzido}}{\text{Álcool teórico}} \times 100$$

3.7 Atividade da enzima e hidrólise enzimática

3.7.1 Determinação da atividade enzimática da celulase

A enzima utilizada foi a Celuclast 1.5L, cedida pelo CTBE, produzida pela Novozymes Corp. Foi determinada a atividade da celulase como atividade de papel de filtro e expressa em FPU por volume de enzima original. Esta análise foi determinada de acordo com recomendações da IUPAC (ADNEY e BAKER, 1996).

A quantificação dos açúcares liberados no meio reacional foi determinada de acordo com o método DNS descrito por Miller (1959).

3.7.2 Hidrólise enzimática

Após o pré-tratamento, o material pré-tratado foi submetido à hidrólise enzimática para liberação e quantificação dos açúcares.

Posteriormente a secagem do resíduo resultante do pré-tratamento dos materiais estudados, a hidrólise enzimática foi realizada, utilizando uma concentração de 10% (m/v) de sólidos. O pH das amostras foi ajustado para 4,8 (pH ótimo) e os erlenmeyers de 250mL foram fechados e encubados em estufa microbiológica, com agitações periódicas. A temperatura utilizada durante a hidrólise foi de 50°C, anteriormente determinada como ótima para a enzima.

Tabela 4. Representação das condições de hidrólise enzimática em função da umidade de cada amostra.

AMOSTRA	Umidade	Volume de tampão	Massa seca	Enzima
RB855453	6,8%	83,88mL	10g	1,87mL
SP87-365	8,7%	82,17mL	10g	1,87mL
CTC 4	8,2%	82,62mL	10g	1,87mL
Bagaço	8,7%	82,17mL	10g	1,87mL
IACBIO 1249	7,8%	82,98mL	10g	1,87mL
IACBIO 1230	7,2%	83,52mL	10g	1,87mL

Para investigar as condições de pré-tratamento e verificar quais variáveis do processo influenciam a etapa de pré-tratamento, amostras do líquido reacional de hidrólise (aproximadamente 2mL) foram coletadas em períodos de tempo pré-determinado, isto é, 0, 6, 12, 24, 36, 48 e 72h, e, então, fervidas por 15 minutos, em tubos identificados, para inativação das enzimas (RABELO *et al.*, 2011).

. Visando a produção de glicose, optou-se por trabalhar com carga enzimática de 15 FPU/g de biomassa seca da enzima celulase (RABELO *et al.*, 2011).

Ao final das 72h de hidrólise e coleta do líquido reacional neste tempo, os resíduos restantes foram transferidos para uma peneira de 150 mesh e lavados em água corrente para remoção do açúcar residual (aproximadamente 200mL água). As amostras foram secas a 105°C e armazenadas (RABELO *et al.*, 2011).

3.7.3 Rendimento da hidrólise enzimática

O rendimento da reação ao longo de 72 horas foi calculado, de acordo com a equação que utiliza como base as concentrações de celulose presentes no material pré-tratado e a concentração de glicose final.

3.8 Determinações de macro e micronutrientes

Para determinação de nitrogênio total na massa seca foi retirado uma amostra da matéria-prima desfibrada, seca em estufa a 65°C por 48 horas. Das amostras líquidas (licor e hidrolisado) foram utilizados 2mL de cada material, previamente identificados e armazenados.

Utilizou-se o método de Kjeldahl-Rittenberg que converte o N combinado da amostra à amônia, que é destilada e recebida em solução ácida. A digestão da amostra inclui a conversão do N-combinado ou orgânico à N amoniacal com ácido sulfúrico concentrado e a quente.

Após a digestão ácida da amostra, o NH_4^+ resultante deve ser separado dos reagentes usados para a sua conversão, e também dos outros constituintes do extrato. A amostra a ser destilada é baseificada com solução concentrada de NaOH (18 M). A amônia é destilada por arraste de

vapor, sendo recebida em solução de ácido bórico contendo indicador e titulada diretamente com ácido sulfúrico ou clorídrico padronizado. Nesse ponto, determina-se a concentração de N-total da amostra (TRIVELIN *et al*, 1973).

Potássio, cálcio, magnésio, ferro, manganês, cobre e zinco foram determinados por digestão nitroperclórica, seguida da análise por espectrometria de absorção atômica (MALAVOLTA, *et al*, 1997). Após a digestão, com o extrato obtido, realizou-se a determinação de fósforo total por colorimetria do metavanadato que se baseia na formação de um composto amarelo formado no sistema vanadomolibdofosfórico em acidez de 0,2 a 1,6 N.

3.9 Poder calorífico

O poder calorífico superior foi analisado em bomba calorimétrica IKA (C2000 Basic) acoplado a aparelho para banho de refrigeração IKA (KV 600 Digital). Foram realizadas análises nos materiais in natura, após pré-tratamento e após a hidrólise enzimática.

Visando a transformação dos valores obtidos para o PCS em PCI, foi empregada a equação descrita por Paoliello (2006).

3.10 Microscopia eletrônica de varredura

Esta análise foi desenvolvida no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, e analisadas por meio de elétron-micrografias de varredura.

As amostras secas foram posicionadas de forma a possibilitar uma visualização perpendicular ao sentido das fibras. Foram fixadas com uma fita de carbono junto aos stubs, estrutura cilíndrica metálica utilizada como suporte para as amostras (Figura 8).

Posteriormente, estas foram metalizadas, através do equipamento DESK II - DENTON VACUM, com uma camada de ouro paládio por 12 segundos, deixando as mesmas eletricamente condutivas e possibilitando sua visualização (Figura 7).

Em seguida procedeu-se a avaliação por meio de observação no microscópio eletrônico de varredura (MEV), marca JEOL, modelo JSM5410, utilizando-se nas elétron-micrografias o filme ILFORD FP4 (ISSO 125/22O). Neste estudo, optou-se pelo uso do aumento de 50 e 1000 vezes, para melhor visualização e comparação das imagens. Foi selecionada uma imagem representativa para cada um dos tratamentos.

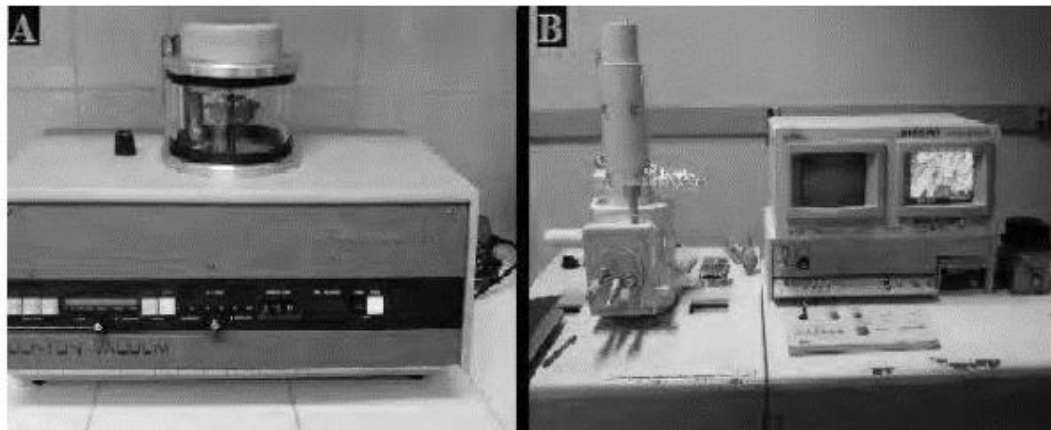


Figura 8. Metalização das amostras com ouro paládio através do equipamento DESK II - DENTON VACUM (A). Visualização microscópica das amostras através do equipamento JOEL- JSM5410 (B).

3.11 Análise Estatística

Os resultados da viabilidade celular, viabilidade de brotos e brotamentos da fermentação, e as análises de nutrientes obtidos, foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas segundo o teste de Tukey (0,05) (SILVA E AZEVEDO, 2002). Os demais resultados são apresentados em forma de valores médios, devido à composição das amostras para avaliação em HPLC.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das biomassas

4.1.1 In natura

A composição da matéria-prima in natura com relação a extrativos, cinzas totais, celulose, hemicelulose e lignina, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Caracterização das biomassas in natura com relação as porcentagens de extrativos, cinzas totais, celulose, hemicelulose e lignina.

%	Extrativos	Cinzas totais	Celulose	Hemicelulose	Lignina
RB855453 palha	18,71	1,10	32,87	29,08	25,33
SP87-365 palha	18,76	2,49	34,54	30,29	23,54
CTC 4 palha	19,96	0,94	32,87	22,05	24,87
Bagaço	1,68	2,84	44,46	36,81	25,95
IACBIO 1249	15,65	4,11	33,91	22,92	29,04
IACBIO 1230	15,14	3,51	31,04	21,30	27,93

Na caracterização dos materiais, observa-se que quando se trabalha com palha e bagaço de cana e cana energia, estes apresentam características distintas, principalmente quando se trata de extrativos, sendo que o bagaço tem menos extrativos do que as demais matérias-primas estudadas. Outros autores (LIRA *et al.*, 2013), também observaram menores valores de extrativos para o bagaço de cana quando comparado com os demais tratamentos.

Este resultado pode ser explicado pelo processamento industrial do bagaço, que passa por diversos ternos de moenda e pela embebição que deve interferir na redução da quantidade de extrativos, que são materiais não estruturais que podem interferir nas etapas analíticas da quantificação da lignina e dos carboidratos.

Os resultados de cinzas, celulose, hemicelulose e lignina estão de acordo com os valores observados por outros autores, em que o bagaço

apresenta maior teor de cinzas, maiores teores de celulose e lignina que a palha de cana.

Rocha *et al.*, 2012 caracterizaram quimicamente diferentes amostras de bagaço de cana-de-açúcar e verificaram composição média de 43,1% para celulose, 25,2% para hemicelulose e 22,9% para lignina e Roviero *et al.*, 2015 caracterizou amostras de palha e observou composição média de 37,32% para celulose, 35,98% para hemicelulose e 5,52% para lignina.

Não há pesquisas recentes sobre caracterização de cana energia, no entanto, como pode ser observado neste estudo, que sua composição é equivalente a palhada de cana das variedades utilizadas, podendo destacar uma maior quantidade de cinzas e lignina, o que pode ser esperado, já que essas cultivares são geneticamente modificadas para serem utilizadas para a geração de energia.

4.1.2 Após o pré-tratamento

A composição da matéria-prima após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, com relação a cinzas totais, celulose, hemicelulose e lignina, estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Caracterização da biomassas pré-tratadas com relação as porcentagens de cinzas totais, celulose, hemicelulose e lignina.

%	Cinzas totais	Celulose	Hemicelulose	Lignina
RB855453 palha	1,29	53,16	8,59	36,08
SP87-365 palha	2,01	43,08	10,47	39,61
CTC 4 palha	1,07	43,90	12,40	41,58
Bagaço	0,46	65,66	3,06	29,65
IACBIO 1249	1,56	63,07	3,19	30,28
IACBIO 1230	1,94	55,69	1,17	39,52

De acordo com os resultados que podem ser observados na Tabela 6, é possível afirmar que a quantidade de cinzas do material pré-tratado não foi muito diferente da encontrada no material in natura, sendo que os dois clones de cana energia apresentaram as maiores reduções.

Os teores de celulose e lignina aumentaram significativamente sendo o aumento de celulose de 29 a 63% e para a lignina principalmente para a palhada das diferentes variedades, ficando em torno de 40%.

A hemicelulose chegou a ser reduzida mais de 90% principalmente para o bagaço e os dois clones de cana energia, esse resultado demonstra a eficiência do pré-tratamento utilizado neste estudo.

Pereira *et al.* (2011) encontraram 43,60% de celulose; 8,75% de hemicelulose; e 33,75% de lignina e cinzas. Wanderley *et al.* (2013) encontraram 49,66% de celulose; 7,94% de hemicelulose; e 34,59% de lignina em estudos com pré-tratamento com explosão a vapor.

4.1.3 Após a hidrólise enzimática.

Após 72 horas da realização do processo de hidrólise enzimática, o hidrolisado foi separado da parte sólida. As características do resíduo sólido estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Caracterização das biomassas após hidrólise enzimática com relação as porcentagens de cinzas totais, celulose, hemicelulose e lignina.

%	Cinzas totais	Celulose	Hemicelulose	Lignina
RB855453 palha	1,88	50,79	6,29	41,08
SP87-365 palha	3,16	41,77	9,04	43,15
CTC 4 palha	1,30	41,08	10,15	45,26
Bagaço	1,23	58,96	1,92	39,18
IACBIO 1249	1,36	56,31	1,32	41,66
IACBIO 1230	2,34	54,25	1,08	44,23

De acordo com os resultados obtidos na caracterização dos materiais na Tabela 7, pode-se concluir que a hidrólise enzimática não foi eficiente, já que o material residual ainda contém em torno de 50% de celulose, que poderia ter sido convertida em glicose pela ação da celulase.

Considerando-se a constituição do material pré-tratado, a taxa de conversão foi de 3 a 10% em média, sendo que uma maior carga de

enzima ou até a utilização de enzimas complementares poderiam tornar este processo mais eficiente.

Também deve-se destacar os teores de lignina que se apresentam em torno de 40%, sendo que este material ainda tem grande potencial para ser utilizado na co-geração de energia elétrica, através de sua queima nas caldeiras industriais.

4.2 Análises realizadas no licor

4.2.1 Açúcares e produtos de degradação da lignina

A Tabela 8 apresenta os valores de açúcares e produtos de degradação contidos no licor obtido após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído.

Tabela 8. Resultados da composição média do licor obtido após o pré-tratamento com ácido diluído com relação a glicose, xilose, arabinose, ácido acético e celobiose.

g/L	Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido Acético	Celobiose
RB855453 palha	1,57	17,46	2,12	1,49	Nd
SP87-365 palha	1,49	11,83	1,80	0,82	0,38
CTC 4 palha	1,58	5,87	2,81	0,56	0,47
Bagaço	Nd	10,54	1,17	0,83	0,98
IACBIO 1249	2,32	15,09	1,26	1,05	0,57
IACBIO 1230	2,17	14,69	1,71	0,95	0,43

Nd: não detectado.

A concentração de xilose obtida para os tratamentos estudados neste experimento chega a ser 11 vezes maior do que para os outros açúcares, o que favorece a utilização deste para pesquisas com microrganismos fermentadores de xilose.

Pode-se observar na Tabela 8 maiores teores de glicose obtidos para os clones de cana energia. A maior quantidade de xilose está apresentada no licor da palhada da variedade RB855453 sendo superior ao estudado

por Arruda (2011) que trabalhou com bagaço de cana e obteve valores em torno de 15 brix. Esta também apresenta os maiores teores de ácido acético, que são provenientes da quebra dos grupos acetil presentes na hemicelulose.

A maior quantidade de celobiose foi observada no tratamento em que se utilizou o bagaço de cana como matéria-prima, sendo esta a que apresentou resultados inferiores aos demais tratamentos, no que se refere a quantidade de açúcares.

Tabela 9. Resultados médios de brix, pH e compostos fenólicos no licor obtido após pré-tratamento com ácido diluído.

	Brix	pH	Compostos fenólicos g/L
RB855453 palha	4,6	0,07	1,014
SP87-365 palha	4,3	0,44	1,019
CTC 4 palha	3,9	0,45	1,003
Bagaço	3,9	0,11	0,527
IACBIO 1249	4,6	0,06	0,794
IACBIO 1230	5,6	0,08	0,966

Os resultados médios de brix (Tabela 9) indicam pouca diferença entre os tratamentos, sendo que o clone de cana energia IACBIO 1230 apresenta os maiores valores, entretanto, são valores acima dos observados por Arruda (2011). Todos os valores de pH apresentam-se abaixo de 1, o que se explica pelo uso de ácido sulfúrico durante o pré-tratamento.

Com relação aos compostos fenólicos, os maiores resultados podem ser observados para as 3 palhadas de diferentes cultivares de cana de açúcar. Arruda (2011) obteve 5,48 g/L de compostos fenólicos em seu estudo com hidrólise ácida de bagaço de cana. Estes compostos são produtos de degradação da lignina que se fazem presentes nos licores provenientes de pré-tratamento utilizando-se ácidos (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000).

4.2.2 Avaliação do licor concentrado

Após a obtenção do licor, este passou por um processo de concentração em rotaevaporador a vácuo de simples efeito, com a intenção de aumentar os teores de açúcares.

Tabela 10. Resultados médios de composição do licor após o processo de concentração.

	Brix	pH	Compostos fenólicos g/L
RB855453 palha	9,9	0,87	2,337
SP87-365 palha	9,6	0,97	2,370
CTC 4 palha	11,9	1,27	3,213
Bagaço	13,3	0,71	2,001
IACBIO 1249	13,0	0,84	2,802
IACBIO 1230	12,8	0,83	2,653

Na Tabela 10 observa-se o aumento do teor de sólidos solúveis, bem como os teores de compostos fenólicos presentes que estão cerca de três vezes acima dos valores máximos recomendados para o processo fermentativo que deve ser de 0,5g/L segundo Amorim (2005).

Como consequência do processo de concentração à vácuo, verificou-se o aumento do pH do licor, oposto do ocorrido em trabalho realizado por Arruda (2011), que observou redução do pH como resultado do aumento de íons H^+ provenientes do ácido sulfúrico utilizado na etapa de pré-tratamento.

A concentração se faz necessária com o intuito de aumentar o teor de xilose favorecendo a produção de etanol.

4.2.3 Resultados da destoxificação do licor e preparo do mosto

A destoxificação é realizada após o processo de concentração do licor, com o objetivo da retirada de compostos que podem inibir o processo fermentativo, sem, porém, reduzir os teores de açúcares. Como resultado

deste processo, temos o mosto, que deve estar apto para o processo fermentativo.

Tabela 11. Resultados médios de glicose, xilose, arabinose e ácido acético no mosto.

g/L	Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido Acético
RB855453 palha	2,905	41,770	7,685	1,723
SP87-365 palha	0,690	27,796	7,846	1,382
CTC 4 palha	0,617	13,365	7,974	1,557
Bagaço	3,313	67,090	8,095	3,125
IACBIO 1249	10,175	58,104	3,370	0,591
IACBIO 1230	10,361	55,182	4,746	1,718

Os maiores teores médios de glicose (Tabela 11) podem ser observados nos licores provenientes do pré-tratamento dos clones de cana energia. Para xilose, o maior valor foi para o bagaço de cana, que apresenta quase 10g/L a mais do encontrado para os clones de cana energia.

Fugita (2010) após a concentração do licor obtido do pré-tratamento ácido do bagaço de cana, obteve valores de xilose em torno de 47,71 g/L de xilose valor inferior ao encontrado neste experimento, já que o tratamento utilizando-se bagaço, foi o que apresentou maiores resultados.

Os teores médios de arabinose foram da ordem de 7g/L para a palhada das 3 variedades de cana. O teor médio de ácido acético no mosto provenientes do pré-tratamento do bagaço foi cerca de 3 vezes maior do que os outros tratamentos.

Na Tabela 12 pode-se destacar uma pequena queda nos teores médios de brix quando comparados com o licor concentrados, o que indica a efetividade do processo de destoxificação no que se diz respeito a manutenção dos teores de açúcares presentes.

Tabela 12. Resultados médios de composição do mosto após o processo de concentração e destoxificação do licor com relação ao brix, pH e compostos fenólicos.

	Brix	pH	Compostos fenólicos g/L
RB855453 palha	9,1	4,17	1,598
SP87-365 palha	9,2	4,15	1,869
CTC 4 palha	11,1	4,12	2,237
Bagaço	11,9	4,11	1,646
IACBIO 1249	11,8	4,14	2,078
IACBIO 1230	12,1	4,08	2,086

Além disso, observa-se um aumento de cerca de quatro vezes no pH de todos os tratamentos estudados, chegando a concentrações aceitáveis para a fermentação que ficam entre $4 \pm 0,5$ (AMORIM, 2005).

Apesar da alta concentração de compostos fenólicos após a destoxificação, quando se compara com o licor concentrado (Tabela 12), observa-se uma redução média de cerca de 0,5g/L, podendo indicar que a realização de mais uma batelada deste processo, poderia reduzir ainda mais estes compostos, fazendo com que a fermentação não seja afetada negativamente por eles.

Considerando-se à eficiência da remoção dos compostos fenólicos, os resultados obtidos por Narciso *et al.* (2009), que obteve 91,82%, são superiores aos conseguidos neste estudo que foram em torno de 40% para a palhada da variedade CTC 4 e em torno de 18% para o bagaço de cana.

4.3 Fermentação do licor

4.3.1 Análises de viabilidade celular

Para o processo fermentativo, é recomendável que a levedura apresente viabilidade celular superior a 90% (AMORIM, 2005). Neste estudo, a viabilidade celular do inóculo, foi de 97,96% de células vivas, no entanto, 40 minutos após a inoculação do mosto, quando se considerou o início da fermentação, a viabilidade celular foi reduzida de modo

significativo (Tabela 13). Esta redução pode ser explicada pelo alto teor de compostos que interferem na fermentação, como ácidos e compostos fenólicos.

Tabela 13. Resultados de viabilidade celular, viabilidade de brotos e brotamentos da fermentação do mosto obtido através da concentração e destoxificação do licor.

Mosto	Viabilidade Celular (%)	Brotamentos (%)	Viabilidade dos Brotos (%)
RB855453 palha	59,37BC	8,70A	29,77 A
SP87-365 palha	65,15A	8,64A	40,12A
CTC 4 palha	60,56ABC	10,25A	38,03A
Bagaço	63,23AB	9,30A	30,39A
IACBIO 1249	60,30ABC	10,20A	29,99A
IACBIO 1230	56,80C	8,34A	26,97A
Teste F	6,12**	0,36ns	2,33ns
DMS (5%)	5,63	6,47	16,28
C.V.	8,27	62,58	44,69
Tempo de fermentação			
Início	66,10A	7,76C	29,67A
4 horas	63,36AB	11,79AB	36,70A
8 horas	61,15ABC	5,74C	35,14A
12 horas	56,23C	7,21C	26,02A
16 horas	58,90BC	8,33BC	33,74A
32 horas	59,66ABC	14,59A	33,99A
Teste F	5,01**	14,22**	1,70ns
DMS (5%)	6,46	3,64	12,63
C. V.	10,82	40,19	39,58
Mosto X Tempo	4,45**	1,78*	2,51**

Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, ns = não significativo, ** = significativo 1% de probabilidade, DMS = desvio mínimo significativo, C.V. = coeficiente de variação.

Neste estudo os tratamentos utilizados foram iguais, no entanto as biomassas são diferentes, o que influenciou também na diferença significativa dos resultados obtidos.

Ao longo da fermentação, foram retiradas amostras para a verificação das condições microbiológicas da levedura (Tabela 13). Entre os mostos estudados pode-se observar diferenças significativas para viabilidade celular, sendo a viabilidade das células na fermentação com mosto preparado a partir do clone de cana energia IACBIO 1230 inferior aos demais.

Quando se compara os períodos de amostragem, pode-se observar diferenças significativas para viabilidade celular (Figura 9). No inóculo da fermentação, a viabilidade média entre os materiais estudados foi maior, com posterior queda, seguida de elevação a partir de 12 horas de fermentação, o que pode ter ocorrido em virtude do processo de adaptação do microrganismo ao mosto.

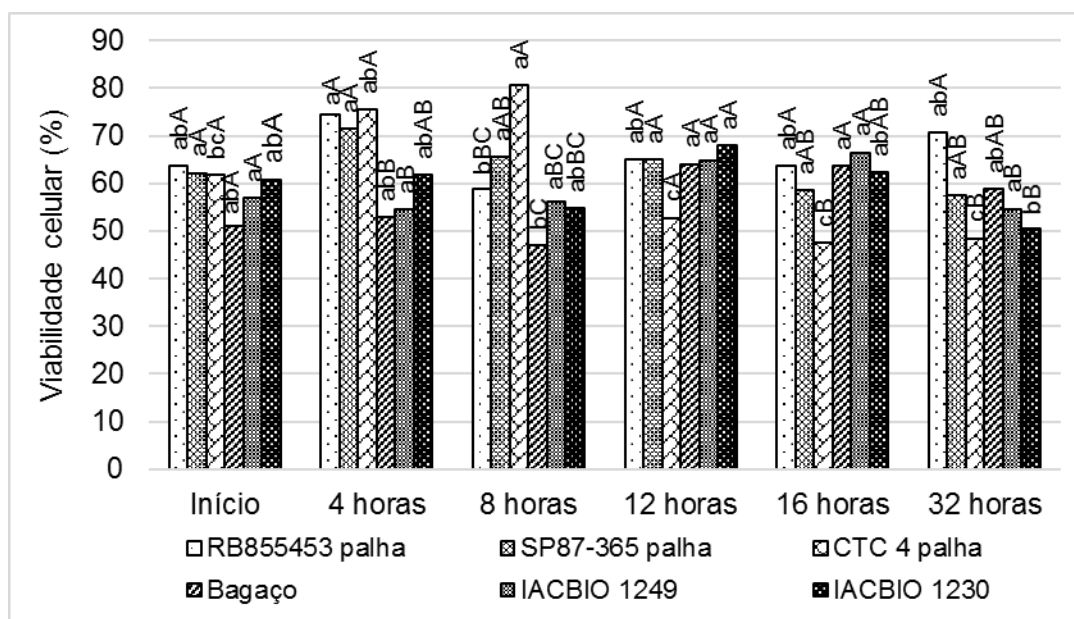


Figura 9. Resultado do desdobramento de brotamentos ao longo da fermentação do licor. Letras maiúsculas para mostos DMS = 15,82; Letras minúsculas para tempos de amostragem DMS = 15,20.

Para brotamentos, houve diferença significativa entre os tempos avaliados (Figura 10), sendo os maiores resultados verificados em 4 e 32 horas de fermentação (17,21%), considerado acima do normal, pois a

porcentagem ideal de brotamentos em um processo fermentativo deve variar entre 5 a 15%, de acordo com Amorim, (2005), sendo que valores acima deste são indicativos de aumento da temperatura ou baixa manutenção do fermento nas dornas.

Segundo Mutton (1998), com a intensificação da fermentação ocorre a elevação da temperatura, levando ao aumento da atividade metabólica das leveduras, e conseqüentemente aumentando o brotamento.

Os resultados obtidos neste estudo são superiores aos verificados por Roviero *et al.*, (2015) que utilizou licor de pré-tratamento ácido de palhada de cana como matéria-prima.

Entretanto, Fujita (2010), utilizando a levedura J10, observou valores de brotamentos da ordem de 37,65%, resultados muito superiores aos encontrados neste estudo.

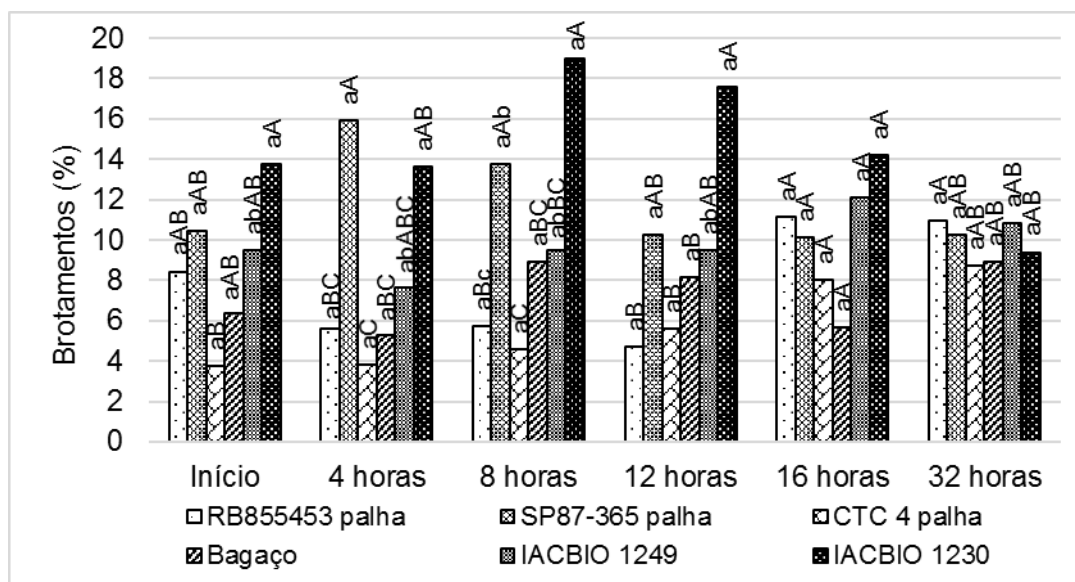


Figura 10. Resultado do desdobramento de brotamentos ao longo da fermentação do licor. Letras maiúsculas para mostos DMS = 8,92; Letras minúsculas para tempos de amostragem DMS = 9,92.

Com relação à viabilidade de brotos da levedura ao longo do período de amostragem, não houve diferença significativa. No entanto, a interação entre mostos e tempos de amostragem apresentaram diferenças significativas (Figura 11). É importante que os brotos sejam viáveis, pois no processo de produção de etanol há o reciclo de células ao longo de toda a safra.

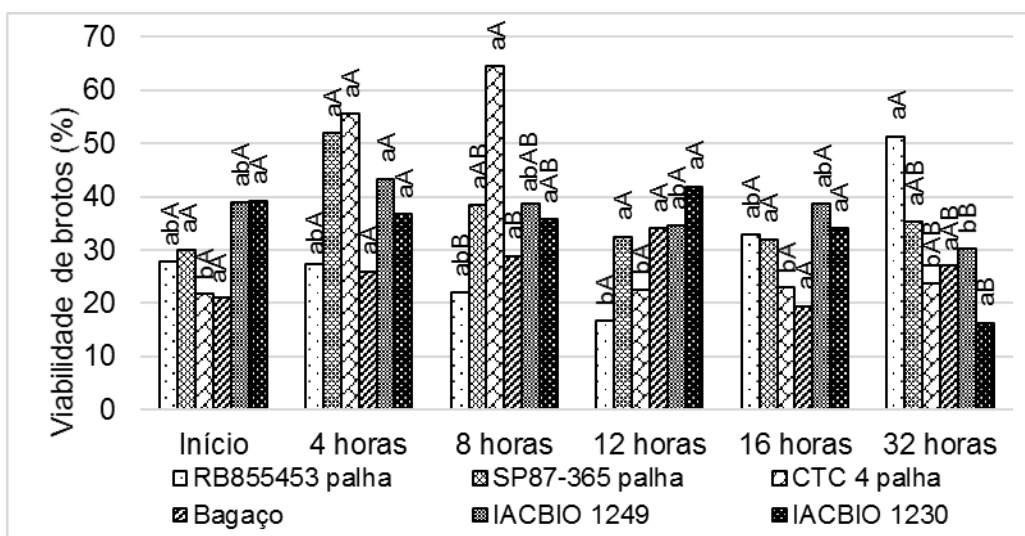


Figura 11. Resultado do desdobramento de Viabilidade de Brotos ao longo da fermentação do licor. Letras maiúsculas para mostos DMS = 30,94; Letras minúsculas para tempos de amostragem DMS = 31,50.

4.3.2 Assimilação de açúcares na fermentação do licor

Na composição do mosto, pode-se observar que estavam contidos três tipos de açúcares.

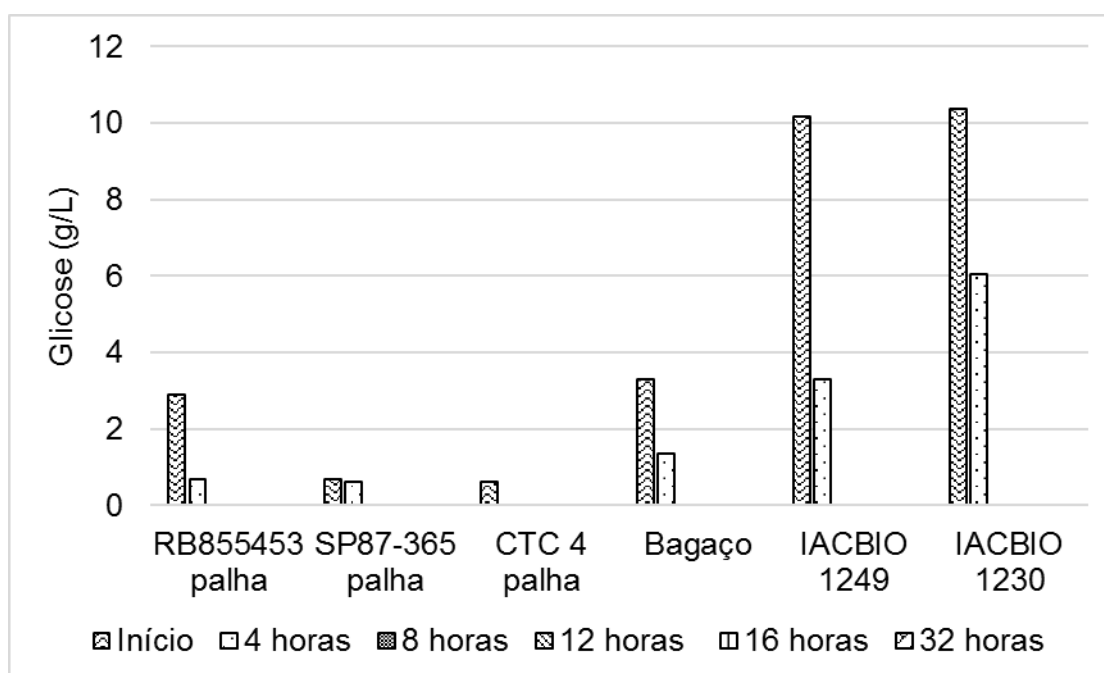


Figura 12. Representação da assimilação média de glicose de quatro materiais ao longo de 32 horas de fermentação.

Os teores de açúcares, bem como seu consumo são diferentes o que pode ser explicado em virtude dos teores destes nas diferentes biomassas estudadas.

O açúcar encontrado em menores proporções foi a glicose, sendo esta assimilada nas primeiras quatro horas de fermentação (Figura 12). A rápida assimilação de glicose também já foi observado em hidrolisados de bagaço de cana (CHENG *et al.*, 2008).

A arabinose, no entanto, não foi consumida ao longo das 32 horas no processo fermentativo. Segundo Schirmer-Michel *et al.*, (2008), nas primeiras 24 horas de cultivo as hexoses são esgotadas, seguidas por pentoses.

As maiores quantidades de xilose no início do processo fermentativo, entre as palhas das diferentes variedades a RB855453 foi a que apresentou maiores quantidades de xilose, estando abaixo apenas do bagaço de cana (Figura 13).

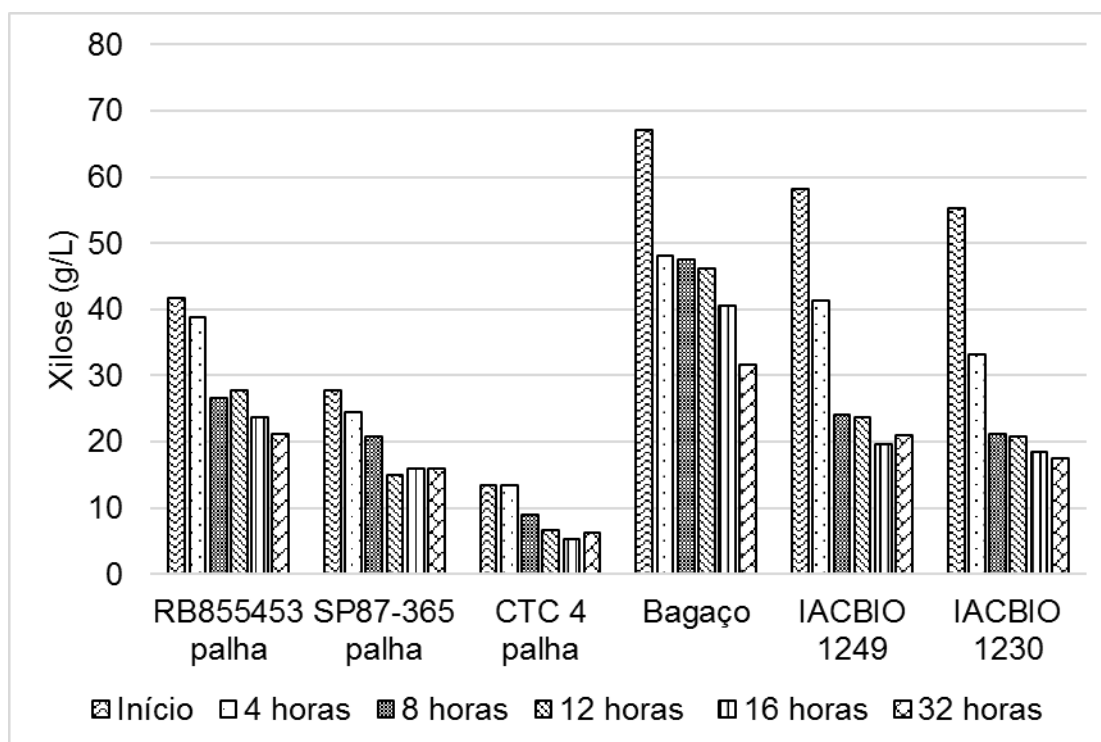


Figura 13. Representação da assimilação média de xilose de quatro materiais ao longo de 32 horas de fermentação.

A assimilação de xilose (principal açúcar do mosto de hidrolisado hemicelulósico) no entanto não foi total. O sistema de transporte de monossacarídeos em *S. cerevisiae* tem uma afinidade cerca de 200 vezes mais baixa para xilose do que para glicose (KÖTTER e CIRIACY, 1993).

Em geral, em todas as fermentações, houve consumo de cerca de 50% para todos os materiais estudados na quantidade de xilose ao longo dos períodos amostrados na fermentação.

4.3.3 Comportamento do ácido acético na fermentação do licor

Foi possível observar neste estudo, a produção de ácido acético (Figura 14), o que não é desejável, pois as fontes de carbono disponíveis acabam sendo desviadas do objetivo inicial que é a produção de etanol.

De acordo com Mcmillan (1993) durante a fermentação etanólica pode ocorrer a formação de outros produtos, como acetato, acetona, 2,3-butanediol, butanol, butirato, formato, isopropanol, lactato, 1,2-propanediol (propilenoglicol), e/ou succinato. A quantidade e o tipo do coproduto formado variam com o microrganismo e de acordo com a composição do substrato.

O aumento da concentração de ácido acético nos licores pode ter ocorrido por ocasião da utilização do etanol como substrato pelas leveduras, pela conversão do etanol em acetaldeído, e este em acetato (WALKER, 1998); ou em ácido acético por processos de oxidação.

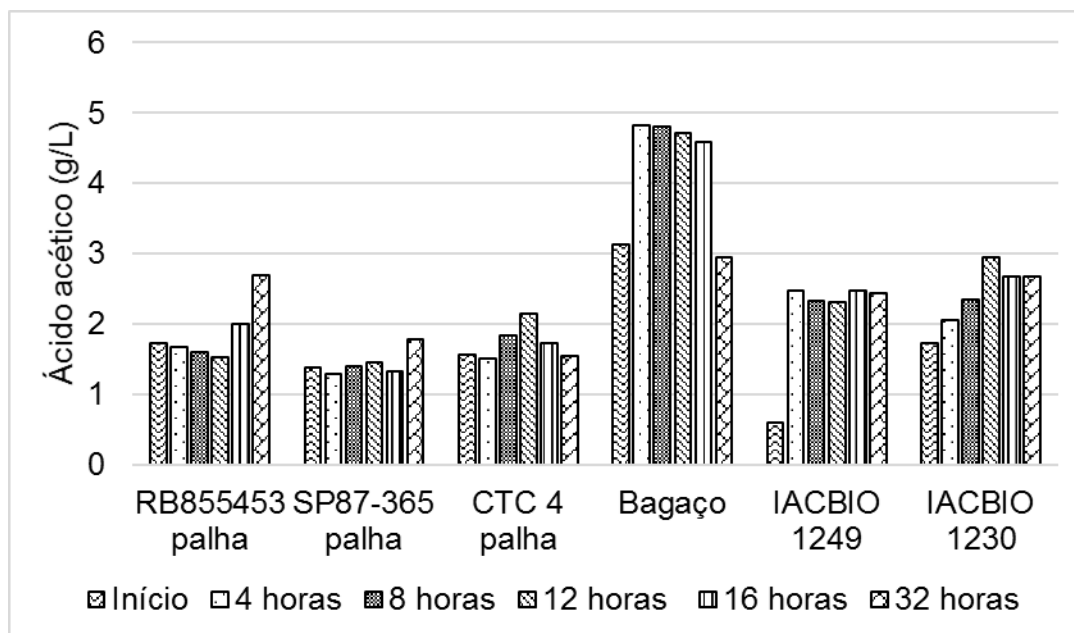


Figura 14. Representação da produção média de ácido acético ao longo de 32 horas de fermentação.

4.3.4 Produção de etanol na fermentação do licor

Observou-se que houve aumento na quantidade de etanol produzido ao longo dos períodos de amostragem em todos os tratamentos estudados (Figura 15), o que pode ter acontecido em virtude da utilização de diferentes biomassas.

O processo fermentativo foi conduzido até 36 horas, baseado em estudos realizados por Roviero *et al.*, 2015, que observaram que a partir de 36 horas, ocorreu perda nos teores de etanol produzido.

A produção de etanol neste estudo foi positiva, embora tenha apresentado teores de etanol inferiores comparando-se às produções obtidas a partir de caldo de cana.

Por outro lado, quando comparada com resultados obtidos por Fugita, (2010), utilizando a levedura J10 em licor obtido a partir de bagaço de cana concentrado e destoxificado, a quantidade produzida de etanol foi superior.

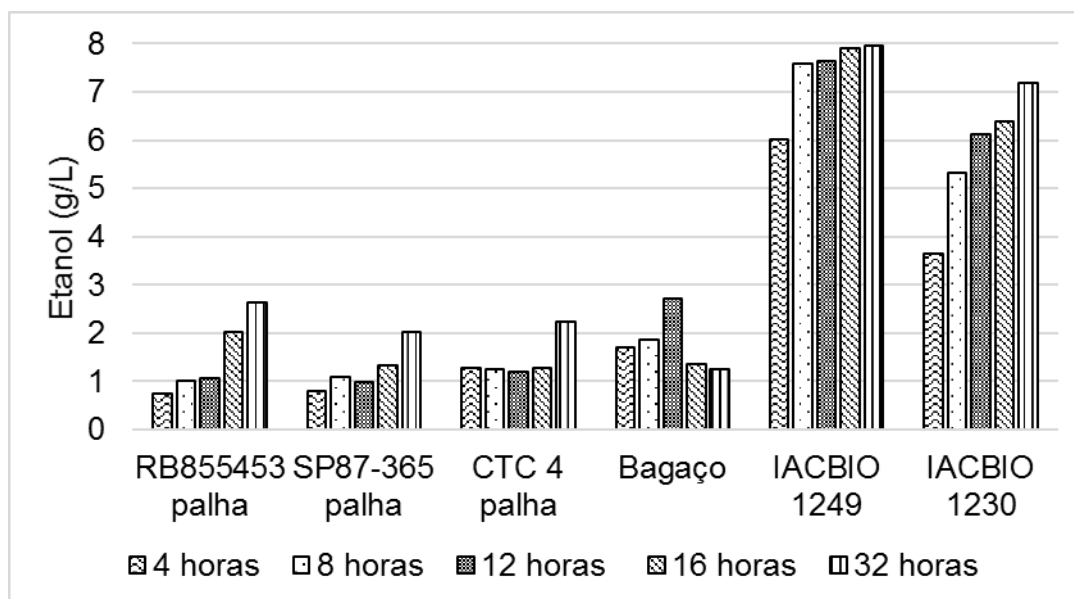


Figura 15. Representação da produção média de etanol ao longo de 32 horas de fermentação.

4.3.5 Análise do rendimento fermentativo

Na Figura 16 estão apresentados os valores de rendimento da fermentação dos licores provenientes das diferentes biomassas. Os

maiores rendimentos podem ser observados na palhada da variedade de cana CTC 4 (21,1%), e nos clones de cana energia IACBIO 1230 (21,0%) e IACBIO 1249 (22,9%).

Estes resultados podem ser explicados pela alta concentração de contaminantes, principalmente de ácido acético, que no tratamento em que se utilizou o bagaço de cana (rendimento de 3,3%), os teores de ácido foram até 3g/L superiores aos demais tratamentos.

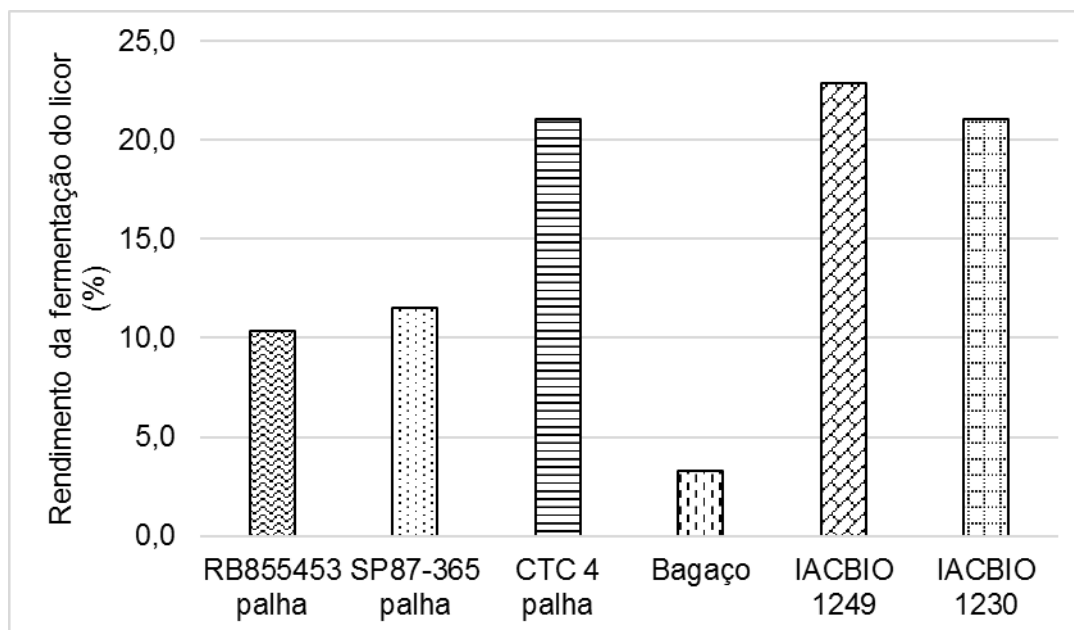


Figura 16. Resultados do cálculo de rendimento da fermentação do licor (%) das biomassas estudadas.

Outro fator determinante no rendimento da fermentação dos licores foram os teores de nutrientes contidos em cada tratamento. Observando-se os teores de Potássio (2,50 mg/Kg), Magnésio (1,50 mg/Kg), Zinco (0,25 mg/Kg), Manganês (3,25 mg/Kg), Ferro (0,00 mg/g), Nitrogênio (0,06 mg/Kg) e Fósforo (3,15 mg/Kg) no tratamento com bagaço de cana, é possível verificar que estes valores são inferiores aos valores observados nos tratamentos a partir de cana energia que apresentaram os melhores rendimentos.

4.3.6 Análises do vinho após a fermentação do licor

Na Tabela 14 é possível observar os valores médios obtidos da análise do vinho obtido após a fermentação do licor.

Tabela 14. Resultados médios de brix, pH, acidez total e glicerol no vinho obtido após a fermentação do licor.

	Brix	pH	Acidez Total g/L H ₂ SO ₄	Glicerol g/L
RB855453 palha	8,3	3,54	4,9	3,88
SP87-365 palha	8,1	3,68	3,79	5,12
CTC 4 palha	9,2	3,70	3,79	7,14
Bagaço	10,6	3,55	4,9	2,51
IACBIO 1249	9,0	3,78	3,92	8,95
IACBIO 1230	9,6	3,79	4,16	10,97

Comparando-se os teores de brix avaliados ao final da fermentação, com os valores obtidos no mosto, é possível concluir que foram consumidos de 1 a 3% do total de sólidos solúveis presentes. Este resultado pode ser justificado pela arabinose que não foi metabolizada pela levedura, além da xilose que não foi consumida completamente. A grande quantidade de compostos fenólicos presentes, pode ter interferido negativamente na atividade da levedura, influenciando no não consumo total dos açúcares disponíveis.

Ainda neste contexto, observa-se na Tabela 20 a redução do pH e o aumento da acidez total, o que pode indicar contaminação da fermentação por outros microrganismos, ou que a levedura, por condições adversas, tenha produzido ácidos.

O glicerol é composto secundário formado em maior quantidade nas células de leveduras, e este subproduto da fermentação compete com a produção de etanol pela utilização do poder redutor do NADH, pois está presente na mesma via de obtenção do etanol (LEHNINGER, 2000). Por isso quando há o aumento da produção de glicerol tem-se menos etanol produzido (AMORIM *et al.*, 2005).

No geral, estes valores de glicerol são considerados muito altos em comparação com os resultados obtidos por Arruda, 2011, que observou valores em torno de 4g/L.

4.4 Hidrólise enzimática da celulignina

4.4.1 Atividade da enzima celulase

Neste estudo, utilizou-se a enzima Celuclast 1.5L cedida pelo CTBE, e sua atividade foi medida através leitura da absorbância da curva padrão de glicose (DNS), sendo assim foi possível traçar um gráfico linear da concentração de glicose em função da absorbância, obtendo assim uma equação que relaciona as duas grandezas.

A partir das leituras das absorbâncias obtidas após hidrólise enzimática do papel filtro e utilizando a equação obtida através da curva padrão de glicose foi possível determinar a concentração dos ART liberada pela enzima em cada um dos ensaios. Assim, traçou-se uma reta relacionando-se a concentração da enzima em cada uma das diluições em função da massa de glicose liberada por 0,5mL dessa enzima diluída, determinando-se a atividade enzimática (Figura 17).

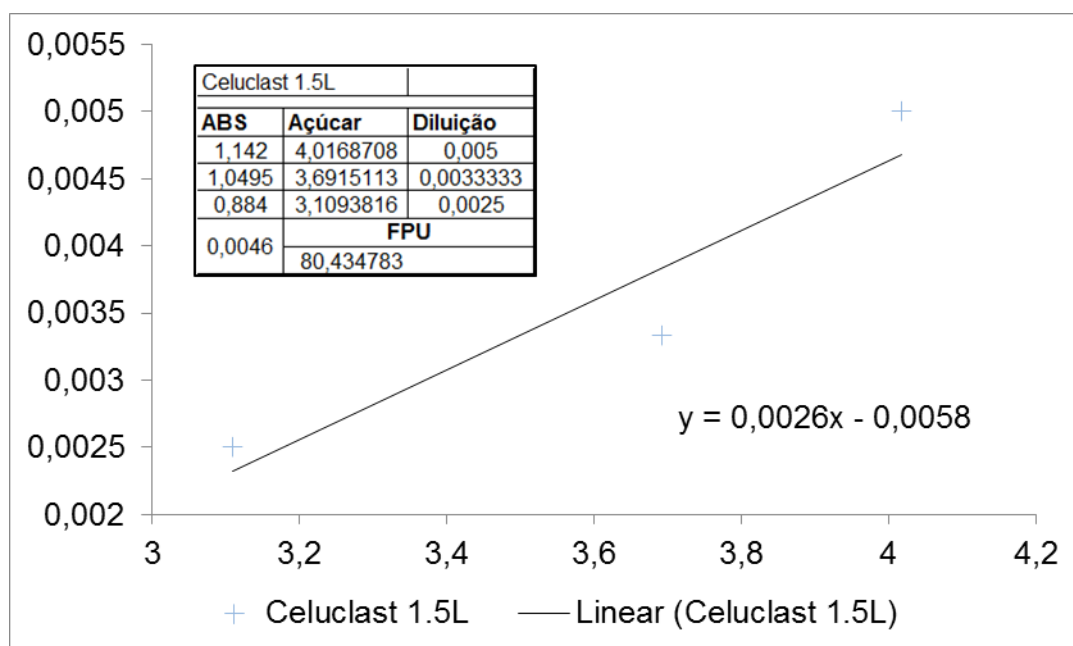


Figura 17. Representação gráfica da atividade da enzima celuclast 1.5L.

Para a celulase, uma unidade da atividade de enzima (FPU) é baseada na liberação de 2,0mg de glicose, ou seja, 2,0/0,18016 μ mol de 50mg de papel de filtro por 0,5mL de enzima diluída em 60 minutos de reação. Neste

experimento, como pode-se observar na Figura 28, a atividade da enzima foi de 80,43 FPU.

4.4.2 Processo de hidrólise enzimática

Para que ocorra a hidrólise enzimática é importante considerar os seguintes fatores: temperatura, tempo, pH, carga enzimática, concentração de substrato, concentração de produtos e características estruturais da biomassa.

Nesta etapa do experimento, para as seis matérias-primas estudadas, optou-se por utilizar uma carga enzimática de 15 FPU/g de biomassa, além de pH 4,8 e temperatura 50°C.

Os resultados médios de glicose obtida ao longo de 72 horas de hidrólise estão apresentados na Figura 18.

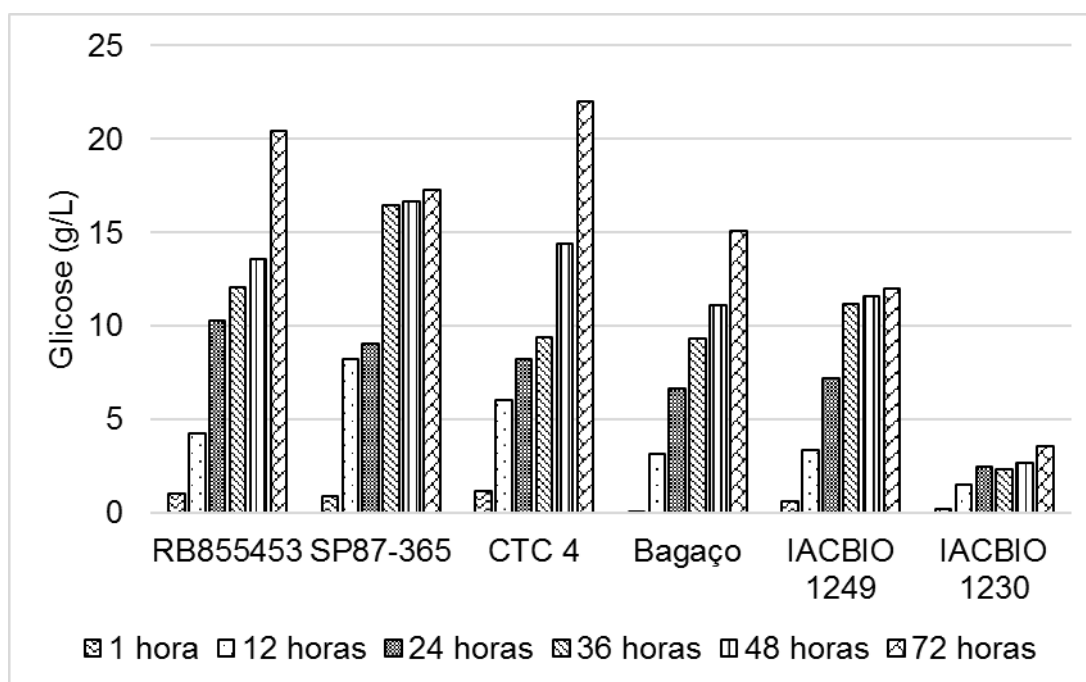


Figura 18. Representação gráfica dos resultados médios de obtenção de glicose ao longo de 72 horas de hidrólise enzimática.

A hidrólise da celulose é caracterizada por um reagente insolúvel (celulose) e por um catalisador solúvel (enzimas). A estrutura da celulose e o modo de ação da enzima influenciam a reação. É um processo lento, já que a celulose de origem biológica tem uma estrutura altamente cristalina e

o número de sítios ativos disponíveis na enzima é limitado (RABELO, 2007).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que houve um aumento na quantidade de glicose em todos os tratamentos estudados ao longo de 72 horas. As maiores quantidades podem ser observadas nas palhadas da variedade RB855453 e da variedade CTC 4. As menores quantidades são observadas nos dois clones de cana energia.

O açúcar obtido da quebra da celulose é a glicose, que é facilmente metabolizada e convertida a etanol pela levedura *Sacharomyces cerevisiae*, inclusive com as cepas selecionadas, utilizadas atualmente nas indústrias sucroenergéticas.

No entanto, os valores obtidos ainda são baixos para serem utilizados em uma fermentação adequada. Neste caso, sugere-se que sejam estudadas novas cargas de enzima e utilização de enzimas auxiliares, para aumentar a conversão de celulose em glicose. Estudos sobre concentração de açúcares e composição com outros materiais, como o caldo de cana e o melaço, avaliando-se diferentes proporções de hidrolisado.

Tabela 15. Resultados médios de brix, acidez total e compostos fenólicos no hidrolisado.

	Brix	Acidez Total g/L H ₂ SO ₄	Compostos fenólicos g/L
RB855453 palha	3,6	0,72	0,341
SP87-365 palha	3,6	0,67	0,338
CTC 4 palha	3,9	0,91	0,469
Bagaço	2,9	0,53	0,188
IACBIO 1249	2,6	0,60	0,504
IACBIO 1230	1,9	0,64	0,426

A quantidade de sólidos solúveis (brix) obtidos após 72 horas de hidrólise (Tabela 15) com a enzima celulase não é suficiente para a fermentação utilizando-se a levedura *Sacharomyces cerevisiae*,

considerando-se que os valores industrialmente utilizados estão entre 18 e 21. Os açúcares são imprescindíveis para que ocorra a inibição das enzimas da respiração da levedura, ocorrendo a produção de etanol através do Efeito Crabtree.

A acidez total do hidrolisado, exceto para o tratamento em que utilizou o bagaço, está em níveis aceitáveis para o processo fermentativo, bem como a quantidade de compostos fenólicos, devendo atingir até 0,8 /L de H_2SO_4 e 0,5g/L respectivamente.

Quando comparado com os resultados de compostos fenólicos no licor, os resultados para estes componentes no hidrolisado são muito inferiores. Estes valores são considerados aceitáveis, segundo Amorim (2005) para uma fermentação eficiente.

4.4.3 Rendimento da hidrólise enzimática

Na figura 19 estão apresentados os resultados de rendimento da hidrólise enzimática.

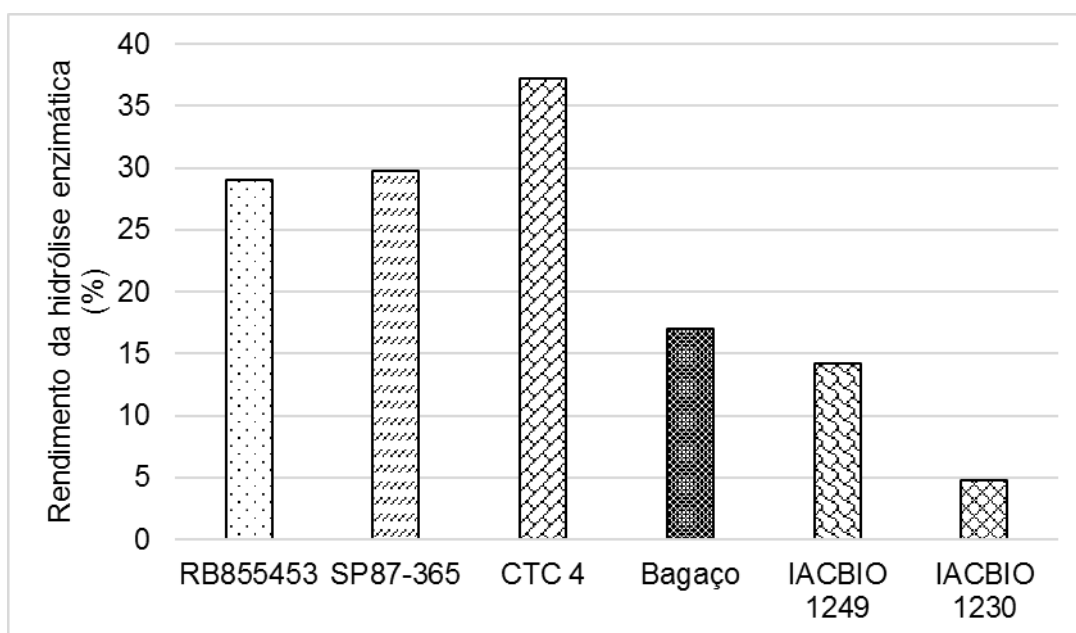


Figura 19. Resultados do cálculo de Rendimento da hidrólise enzimática (%) para as biomassas estudadas.

Normalmente, hidrólises enzimáticas possuem um rendimento de açúcar menor que 20%, enquanto que, se uma etapa de pré-tratamento for utilizada, o rendimento pode alcançar até >90% (LYND, 2002).

Comparando-se os resultados obtidos neste experimento com os da literatura, após o pré-tratamento com ácido diluído, os mesmos estão abaixo dos observados por outros autores sendo os menores valores obtidos pelos clones de cana energia.

A cristalinidade da celulose, área superficial específica, grau de polimerização, proteção da celulose pela lignina e hemicelulose, são consideradas fatores que interferem na eficiência de hidrólise (KIM e HOLTZAPPLE, 2006).

4.5 Nutrientes nas biomassas

Nas Tabelas 16 a 21 estão apresentados os resultados da quantificação de nutrientes nas biomassas.

Avaliando-se os resultados dos materiais estudados, nota-se que os valores obtidos dos nutrientes apresentam diferenças significativas em todos os tratamentos, sendo os menores valores encontrados no bagaço de cana. Esses valores de nutrientes estão abaixo dos valores considerados adequados para o estado de São Paulo analisados por Malavolta *et al* (1997) que utilizou folhas +3 de cana-planta com 4 meses.

Os nutrientes presentes na matéria seca in natura (Tabela 5 e 6) podem ser incorporados no processo fermentativo se forem solubilizados para o licor no processo de pré-tratamento, podendo ser aproveitados pelas leveduras juntamente com o substrato.

Após o processo de pré-tratamento, pode-se observar grande redução nos teores de nutrientes, o que indica a solubilização destes para o meio líquido (licor), podendo assim ser utilizado no processo fermentativo.

Para todos os nutrientes, exceto o sódio, houve diferença significativa entre os teores encontrados nos diferentes tratamentos. O potássio foi o nutriente que apresentou maior redução quando se compara o material seco in natura, com o material seco pré-tratado.

A próxima etapa pela qual este material vai passar é a hidrólise enzimática, objetivando a quebra da celulose em moléculas de glicose que possam ser fermentadas a etanol. Além de glicose, para que ocorra uma

fermentação eficiente, é necessário que haja nutrientes, os quais podem ser transferidos da matéria seca para o hidrolisado.

Para que ocorra um processo de fermentação é necessário que se tenha açúcares, temperatura, pH, vitaminas e nutrientes em quantidades ideais, o que melhora o desempenho da levedura na produção de etanol.

Com relação aos teores de nitrogênio, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* utiliza esse elemento nas formas amoniacal (NH_4^+), amídica (uréia) ou amínica (na forma de aminoácidos) sendo a presença deste nutriente fundamental para a quantidade e tipo de álcool produzido (LIMA *et al.*, 2001).

O fósforo, é de extrema importância para que ocorra a formação de álcool durante a fermentação. Além de favorecer a ação das leveduras, o fósforo também aumenta o rendimento alcoólico da fermentação.

O Magnésio, desempenha um papel importante no crescimento das leveduras como co-fator de muitas reações metabólicas. O Cobre e ferro são necessários em pequenas quantidades, na fase de multiplicação e crescimento da levedura. Zinco e manganês atuam como ativadores enzimáticos na glicólise (AMORIM, 2005), sendo que neste estudo, na análise do hidrolisado enzimático, não foram detectadas quantidades de manganês e magnésio.

Considerando-se que a hidrólise enzimática foi realizada a partir de substrato (celulignina) que continha baixos teores de nutrientes, a pequena quantidade de nutrientes no hidrolisado é justificada.

Estudos posteriores podem ser realizados visando suplementações com sais, ou até com caldo de cana ou melaço de proporções variadas, já que as quantidades existentes são insuficientes para uma fermentação adequada.

Após todas as etapas percorridas neste estudo com as 6 diferentes matérias-primas, é importante que se conheça o material resultante, a fim de avaliar os processos de conversão, além do conhecimento da composição dos resíduos para que se avalie qual a melhor destinação que deve ser dada.

Pode-se considerar ainda, que alterações nos processos de pré-tratamento e hidrólise, podem solubilizar maiores quantidades de nutrientes, que são imprescindíveis para o processo fermentativo.

Tabela 16. Resultados médios dos nutrientes potássio, magnésio, cobre, zinco, manganês, cálcio, ferro, sódio, nitrogênio e fósforo na palha da variedade RB855453 in natura, após o pré-tratamento, após a hidrólise enzimática, no licor e no hidrolisado enzimático.

RB855453 palha	Potássio (mg/Kg)	Magnésio (mg/Kg)	Cobre (mg/Kg)	Zinco (mg/Kg)	Manganês (mg/Kg)	Cálcio (mg/Kg)	Ferro (mg/g)	Sódio (mg/g)	Nitrogênio (mg/Kg)	Fósforo (mg/Kg)
In natura	150,00A	13,25A	2,25D	6,50A	67,25A	19,00A	18,85A	0,75B	0,58A	7,27A
Após pré- tratamento	1,00C	2,25BC	4,25BC	3,50B	1,25C	9,75B	2,45C	0,62BC	0,29B	4,56B
Após hidrólise enzimática	0,25C	0,50D	2,75CD	4,00B	0,00C	3,75C	0,45D	0,80B	0,64A	4,45B
Licor	19,00B	2,75B	12,25A	0,00C	23,50B	3,50C	8,15B	0,45C	0,32B	4,99B
Hidrolisado	0,00C	1,00CD	5,75B	3,00B	2,00C	4,25C	0,00D	1,70A	0,06C	4,23B
Teste F	551,37**	351,86 **	135,10**	25,03**	895,45**	341,46**	4295,65**	82,13**	50,80*	243,67**
DMS (5%)	12,96	1,31	1,61	2,16	4,48	1,67	0,56	0,249	0,15	3,03
C.V.	14,15	12,34	11,05	23,71	8,86	7,73	3,49	10,74	15,09	12,39

Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, ** = significativo 1% de probabilidade, DMS = desvio mínimo significativo, C.V. = coeficiente de variação.

Tabela 17. Resultados médios dos nutrientes potássio, magnésio, cobre, zinco, manganês, cálcio, ferro, sódio, nitrogênio e fósforo na palha da variedade SP87-365 in natura, após o pré-tratamento, após a hidrólise enzimática, no licor e no hidrolisado enzimático.

RB855453 palha	Potássio (mg/Kg)	Magnésio (mg/Kg)	Cobre (mg/Kg)	Zinco (mg/Kg)	Manganês (mg/Kg)	Cálcio (mg/Kg)	Ferro (mg/g)	Sódio (mg/g)	Nitrogênio (mg/Kg)	Fósforo (mg/Kg)
In natura	123,50A	17,25A	2,50D	3,50A	49,50A	48,25A	29,68A	0,65C	0,48A	32,71A
Após pré- tratamento	0,25C	2,00C	2,75D	1,75A	1,00C	14,50B	8,77B	0,60C	0,37AB	5,10C
Após hidrólise enzimática	0,00C	0,50C	6,00C	3,00A	0,00C	9,75C	12,45B	0,92B	0,46A	5,64BC
Licor	39,50B	5,00B	12,25A	2,00A	24,00B	6,50C	12,20B	0,50C	0,39AB	10,54B
Hidrolisado	0,50C	0,75C	9,25B	2,25A	2,25C	5,50C	0,00C	1,75A	0,048B	3,80C
Teste F	836,78**	137,66**	223,97**	2,77ns	1059,54**	372,18**	48,68**	95,49**	4,44*	129,96**
DMS (5%)	8,61	2,78	1,31	2,04	3,08	4,31	7,20	0,24	0,39	4,94
C.V.	9,78	20,33	7,44	30,33	7,46	9,50	21,21	10,19	41,28	15,90

Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, ** = significativo 1% de probabilidade, DMS = desvio mínimo significativo, C.V. = coeficiente de variação.

Tabela 18. Resultados médios dos nutrientes potássio, magnésio, cobre, zinco, manganês, cálcio, ferro, sódio, nitrogênio e fósforo na palha da variedade CTC 4 in natura, após o pré-tratamento, após a hidrólise enzimática, no licor e no hidrolisado enzimático.

RB855453 palha	Potássio (mg/Kg)	Magnésio (mg/Kg)	Cobre (mg/Kg)	Zinco (mg/Kg)	Manganês (mg/Kg)	Cálcio (mg/Kg)	Ferro (mg/g)	Sódio (mg/g)	Nitrogênio (mg/Kg)	Fósforo (mg/Kg)
In natura	79,50A	14,50A	4,00C	4,00A	25,75A	22,00A	19,12A	0,70BC	0,66AB	28,90A
Após pré- tratamento	0,75C	2,00C	3,25C	2,00BC	0,00D	8,50B	1,97C	0,62C	0,52B	10,86C
Após hidrólise enzimática	0,00C	0,50D	8,00B	3,00AB	0,00D	8,75B	5,20B	0,82B	0,79A	6,73CD
Licor	61,75B	6,75B	10,25A	2,91AB	10,75B	9,25B	5,02B	0,65C	0,84A	23,36B
Hidrolisado	1,00C	0,75D	0,00D	1,50C	1,25C	2,75C	0,00D	1,57A	0,17C	3,90D
Teste F	664,29**	4217,25**	218,58**	12,29**	2700,95**	218,86**	678,87**	141,83**	42,44**	124,74**
DMS (5%)	7,02	0,42	1,27	1,28	0,99	2,23	1,34	0,15	0,19	4,53
C.V.	9,13	3,23	9,30	17,84	4,91	8,09	7,97	6,64	11,78	11,41

Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, ** = significativo 1% de probabilidade, DMS = desvio mínimo significativo, C.V. = coeficiente de variação.

Tabela 19. Resultados médios dos nutrientes potássio, magnésio, cobre, zinco, manganês, cálcio, ferro, sódio, nitrogênio e fósforo no bagaço in natura, após o pré-tratamento, após a hidrólise enzimática, no licor e no hidrolisado enzimático.

RB855453 palha	Potássio (mg/Kg)	Magnésio (mg/Kg)	Cobre (mg/Kg)	Zinco (mg/Kg)	Manganês (mg/Kg)	Cálcio (mg/Kg)	Ferro (mg/g)	Sódio (mg/g)	Nitrogênio (mg/Kg)	Fósforo (mg/Kg)
In natura	12,00A	4,25A	8,25B	2,25AB	14,50A	6,25A	26,45A	0,82B	0,24C	16,84A
Após pré- tratamento	0,00C	1,00BC	1,00D	0,75BC	0,50CD	1,00B	2,51C	0,67B	0,41A	1,95B
Após hidrólise enzimática	0,00C	0,00C	5,00C	1,75ABC	0,00D	0,00B	6,57B	0,70B	0,32B	10,86AB
Licor	2,50B	1,50B	10,25A	0,25C	3,25B	5,50A	0,00C	0,70B	0,06D	3,15B
Hidrolisado	0,25C	0,25BC	1,25D	3,25A	1,50C	1,00B	0,00C	1,62A	0,06D	3,36B
Teste F	712,00**	38,58**	151,27**	11,79**	415,14**	95,71**	264,61**	56,11**	109,52**	5,10*
DMS (5%)	0,90	1,27	1,56	1,61	1,37	1,37	3,19	0,25	0,06	13,25
C.V.	11,37	33,88	11,28	36,49	12,97	18,63	16,69	10,41	11,40	68,08

Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, ** = significativo 1% de probabilidade, DMS = desvio mínimo significativo, C.V. = coeficiente de variação.

Tabela 20. Resultados médios dos nutrientes potássio, magnésio, cobre, zinco, manganês, cálcio, ferro, sódio, nitrogênio e fósforo no clone de cana energia IACBIO 1249 in natura, após o pré-tratamento, após a hidrólise enzimática, no licor e no hidrolisado enzimático.

RB855453 palha	Potássio (mg/Kg)	Magnésio (mg/Kg)	Cobre (mg/Kg)	Zinco (mg/Kg)	Manganês (mg/Kg)	Cálcio (mg/Kg)	Ferro (mg/g)	Sódio (mg/g)	Nitrogênio (mg/Kg)	Fósforo (mg/Kg)
In natura	62,50A	18,50A	9,75A	5,25AB	34,25A	19,00A	29,27A	0,72B	0,37A	14,89A
Após pré- tratamento	1,75C	1,50C	11,00A	0,75B	1,25C	0,75D	2,67C	0,60D	0,25B	4,01D
Após hidrólise enzimática	0,25C	0,00C	1,25C	1,50AB	0,00C	0,00D	2,22C	0,70BC	0,41A	6,41C
Licor	19,75B	6,75B	1,75C	6,25A	16,00B	7,75B	11,52B	0,62CD	0,29B	11,08B
Hidrolisado	2,25C	1,00C	7,75B	3,50AB	2,25C	3,25C	0,00C	1,75A	0,08C	4,99CD
Teste F	78,58**	121,56**	205,75**	4,39*	121,68**	373,96**	117,46**	574,05**	70,47**	103,29**
DMS (5%)	13,92	3,25	1,47	5,23	6,18	1,87851	5,19	0,09	0,07	2,10
C.V.	29,92	21,79	8,69	56,41	21,39	11,35	21,13	4,02	9,34	9,43

Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, ** = significativo 1% de probabilidade, DMS = desvio mínimo significativo, C.V. = coeficiente de variação.

Tabela 21. Resultados médios dos nutrientes potássio, magnésio, cobre, zinco, manganês, cálcio, ferro, sódio, nitrogênio e fósforo no clone de cana energia IACBIO 1230 in natura, após o pré-tratamento, após a hidrólise enzimática, no licor e no hidrolisado enzimático.

RB855453 palha	Potássio (mg/Kg)	Magnésio (mg/Kg)	Cobre (mg/Kg)	Zinco (mg/Kg)	Manganês (mg/Kg)	Cálcio (mg/Kg)	Ferro (mg/g)	Sódio (mg/g)	Nitrogênio (mg/Kg)	Fósforo (mg/Kg)
In natura	63,75A	26,50A	11,25A	4,00A	40,00A	39,75A	19,57A	0,62BC	0,63A	30,21A
Após pré- tratamento	3,75C	2,00C	8,75AB	1,00B	2,50CD	0,25C	1,37CD	0,57C	0,32AB	5,21B
Após hidrólise enzimática	0,25C	0,00D	1,75C	0,00B	0,00D	0,00C	2,85C	0,72B	0,58A	6,52B
Licor	15,50B	6,00B	1,75C	0,75B	13,00B	7,75B	11,20B	0,65BC	0,40AB	8,58B
Hidrolisado	1,25C	1,00CD	6,25B	0,75B	2,75C	7,25B	0,00D	1,27A	0,09B	3,58B
Teste F	316,63**	736,80**	55,55**	19,35**	817,92**	158,41**	388,16**	98,57**	4,86*	30,35**
DMS (5%)	7,04	1,90	2,63	1,64	2,70	6,10	1,95	0,13	0,46	9,29
C.V.	15,49	9,96	16,49	47,11	8,64	20,63	10,39	6,50	41,54	31,93

Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, ** = significativo 1% de probabilidade, DMS = desvio mínimo significativo, C.V. = coeficiente de variação.

4.6 Resultados das análises de poder calorífico das biomassas

O poder calorífico é a quantidade de energia na forma de calor liberada pela combustão de uma unidade de massa do material combustível. O conteúdo energético das biomassas é quantificado pela unidade do poder calorífico (kcal/kg). As características de calor, fumaça e cinzas geradas na combustão são bastante influenciadas pelas composições químicas do material (ROCCO, 2011).

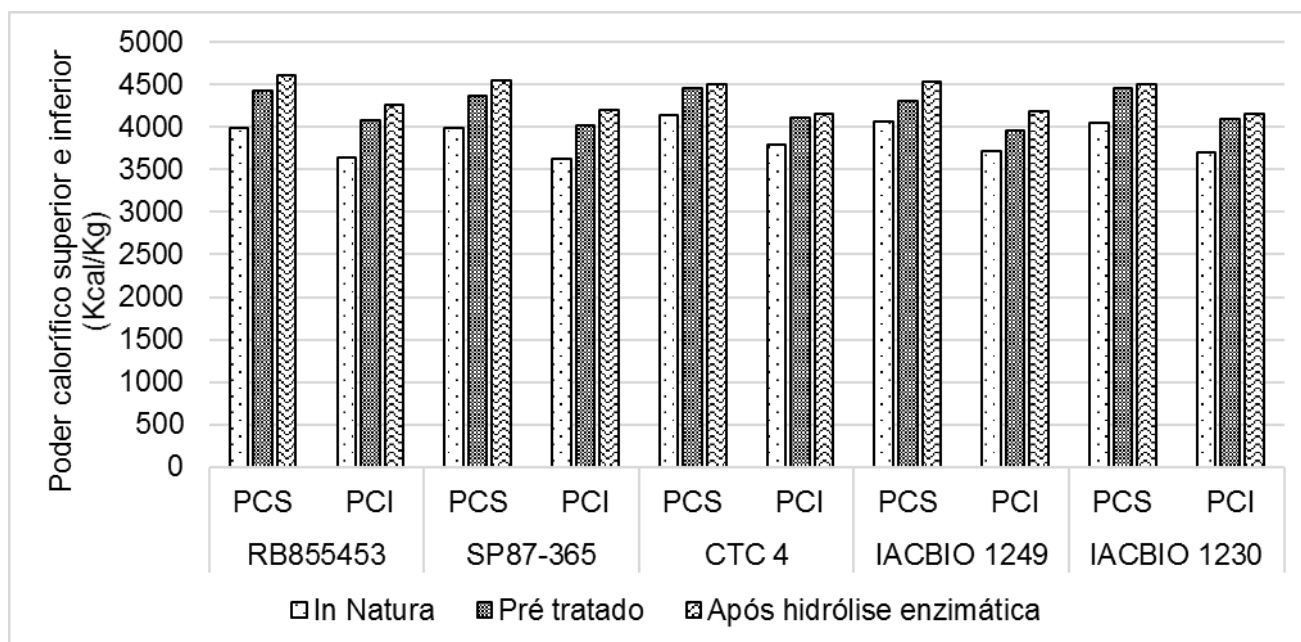


Figura 20. Poder calorífico superior e inferior (Kcal/Kg) das biomassas estudadas in natura, após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática.

A partir da figura 20 é possível observar o comportamento do poder calorífico inferior (PCI) e o poder calorífico superior (PCS), nas biomassas in natura, após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática. A partir desta análise observa-se ao longo das etapas, que o poder calorífico aumentou, sendo que dos materiais in natura para os materiais após a hidrólise enzimática o aumento foi em torno de 500 a 1000kcal/Kg para os tratamentos.

4.7 Resultados da análise de microscopia eletrônica de varredura

A morfologia dos grânulos foi observada através de MEV com aumentos de 50 a 1.000 vezes, o que torna possível observar as alterações estruturais das fibras lignocelulósicas das biomassas.

4.7.1 MEV da biomassa (palha) da variedade RB855453 in natura, após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática

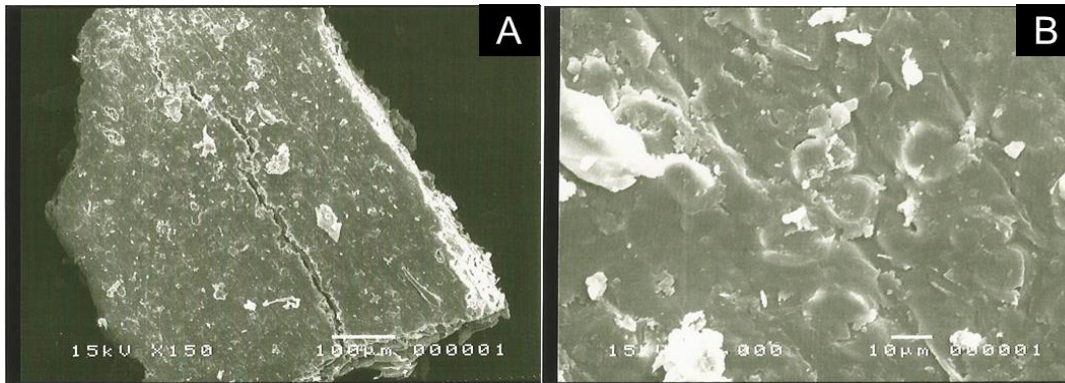


Figura 21. Análise de microscopia eletrônica de varredura RB855453 (palha) in natura (A – aumento de 150x; B – aumento 1000x).

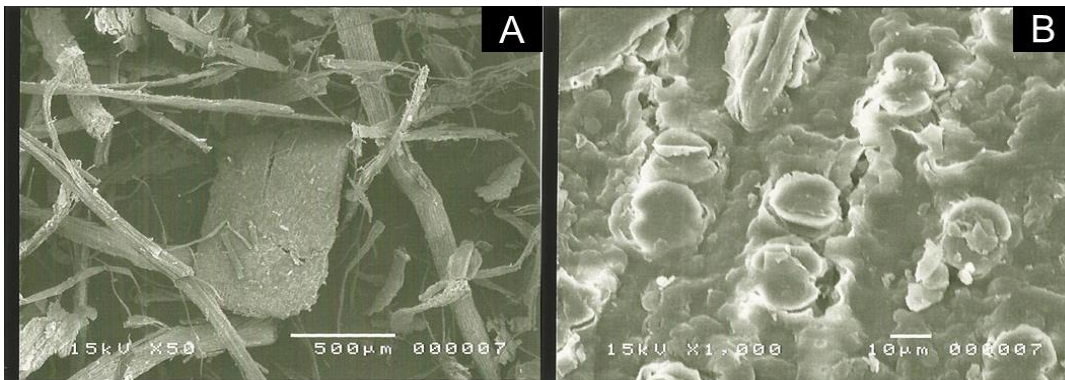


Figura 22. Análise de microscopia eletrônica de varredura RB855453 (palha) pré-tratada (A – aumento de 150x; B – aumento 1000x).

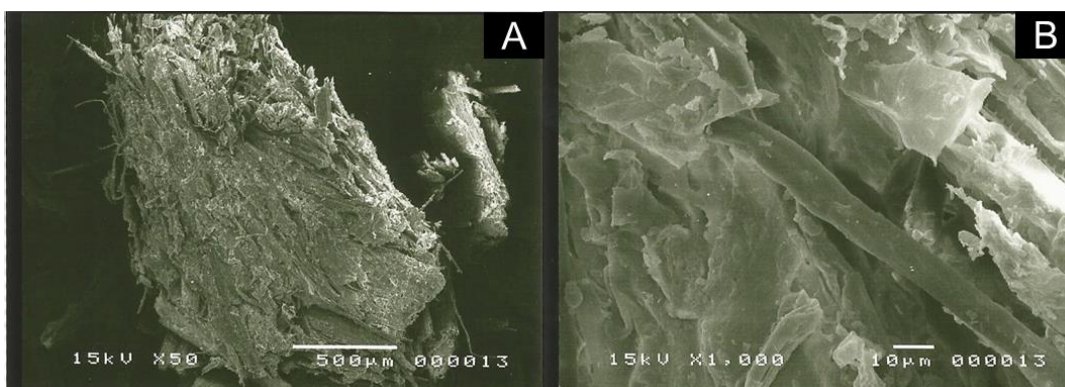


Figura 23. Análise de microscopia eletrônica de varredura RB855453 (palha) após hidrólise enzimática (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).

4.7.2 MEV da biomassa (palha) da variedade SP87-365 in natura, após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática

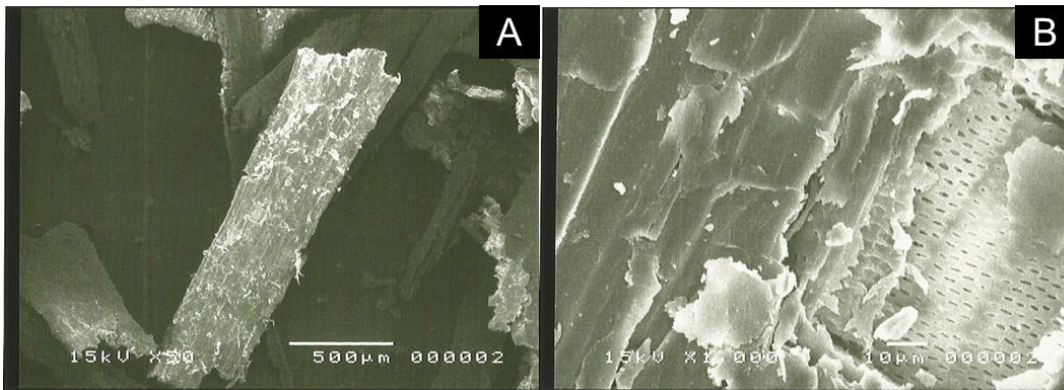


Figura 24. Análise de microscopia eletrônica de varredura SP87-365 (palha) in natura (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).

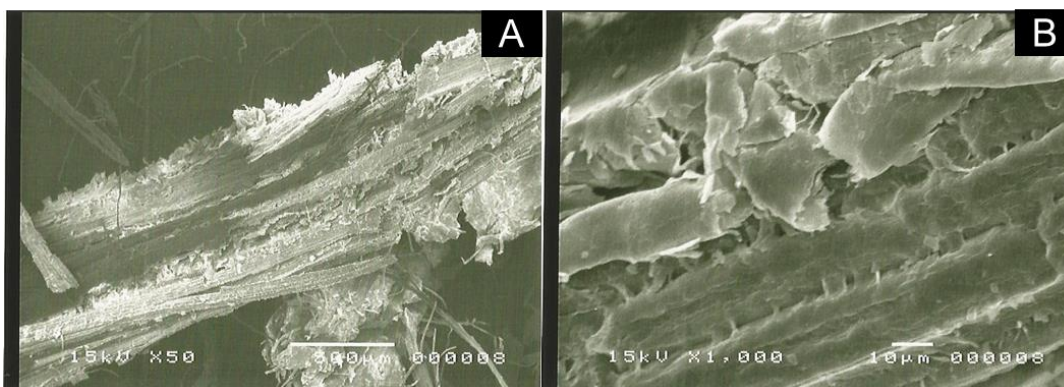


Figura 25. Análise de microscopia eletrônica de varredura SP87-365 (palha) pré-tratada (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).

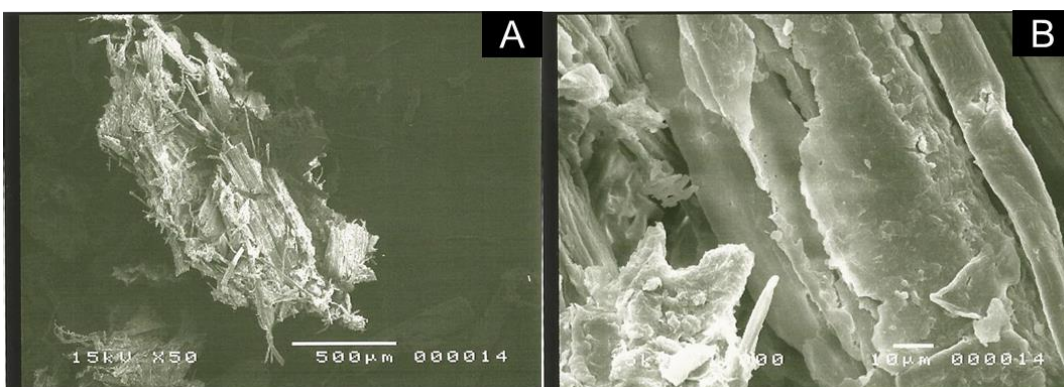


Figura 26. Análise de microscopia eletrônica de varredura SP87-365 (palha) após hidrólise enzimática (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).

4.7.3 MEV da biomassa (palha) da variedade CTC 4 in natura, após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática

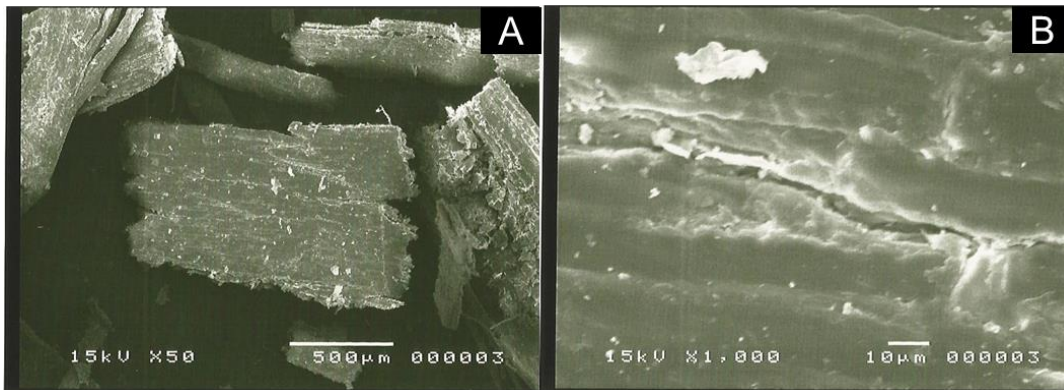


Figura 27. Análise de microscopia eletrônica de varredura CTC 4 (palha) in natura (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).

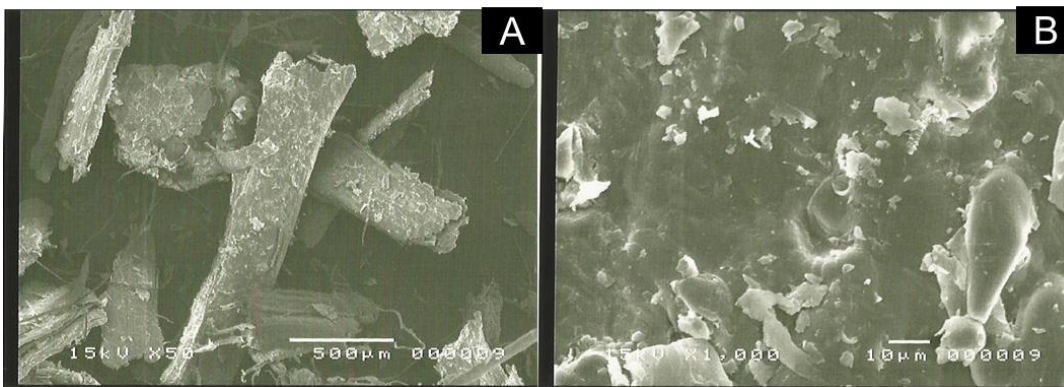


Figura 28. Análise de microscopia eletrônica de varredura CTC 4 (palha) pré-tratada (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).

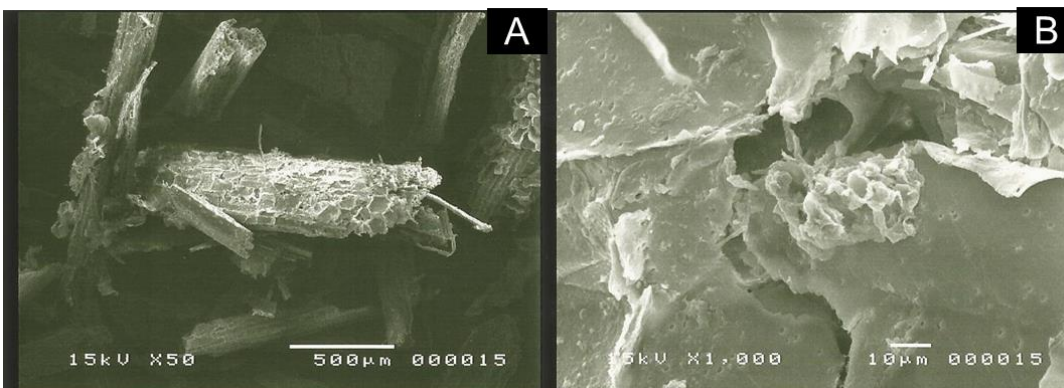


Figura 29. Análise de microscopia eletrônica de varredura CTC 4 (palha) após hidrólise enzimática (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).

4.7.4 MEV da biomassa bagaço de cana in natura, após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática

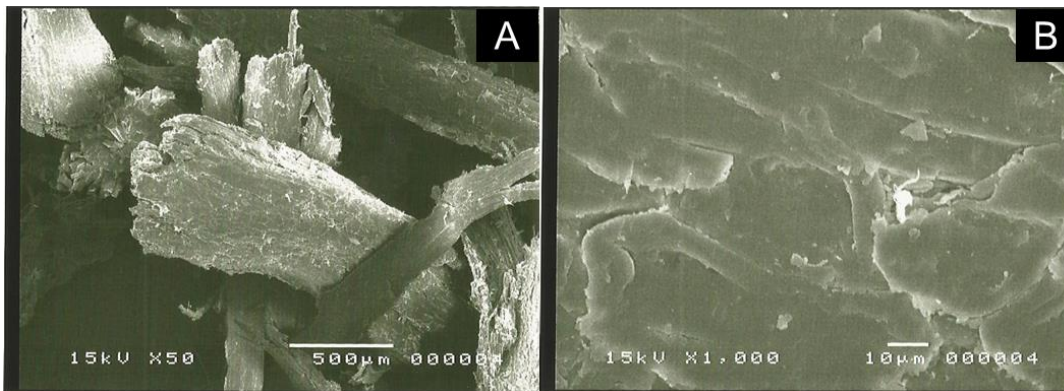


Figura 30. Análise de microscopia eletrônica de varredura bagaço de cana da in natura (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).

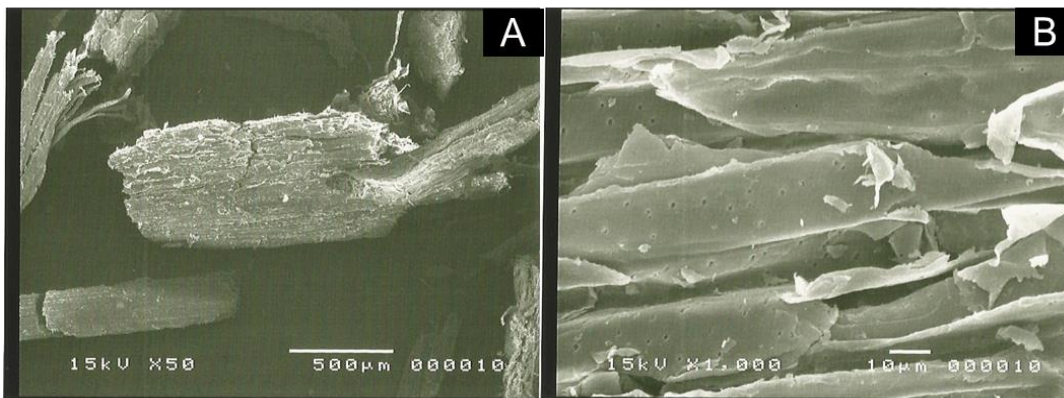


Figura 31. Análise de microscopia eletrônica de varredura bagaço de cana pré-tratado (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).

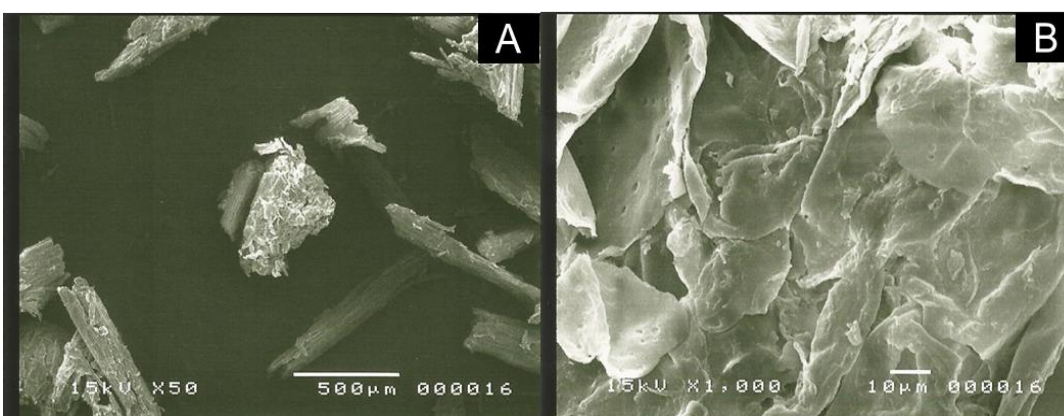


Figura 32. Análise de microscopia eletrônica de varredura bagaço de cana após hidrólise enzimática (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).

4.7.5 MEV da biomassa cana energia IACBIO 1249 in natura, após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática

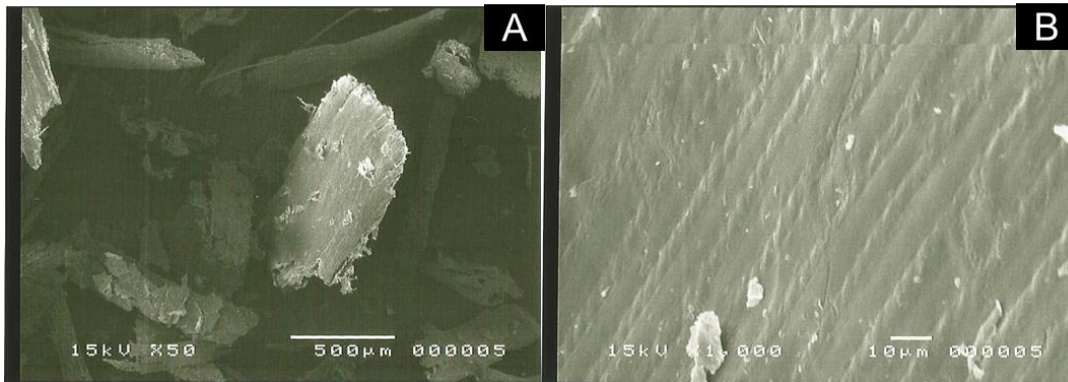


Figura 33. Análise de microscopia eletrônica de varredura IACBIO 1249 (cana energia) in natura (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).

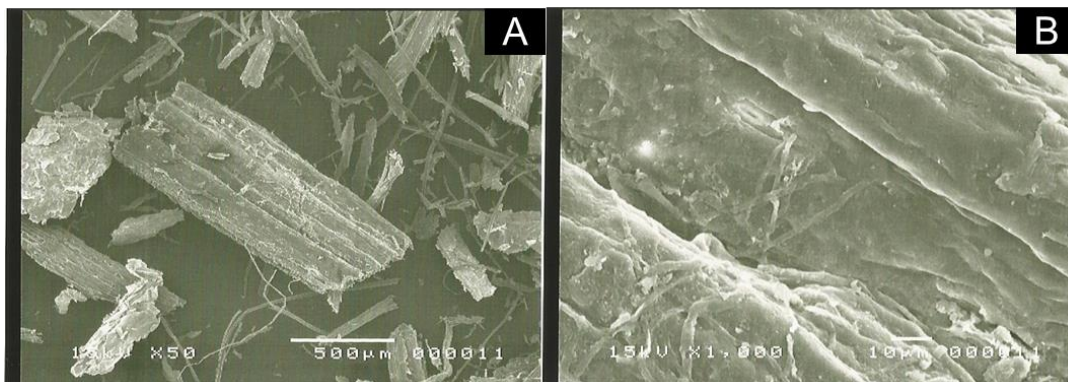


Figura 34. Análise de microscopia eletrônica de varredura IACBIO 1249 (cana energia) pré-tratada (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).

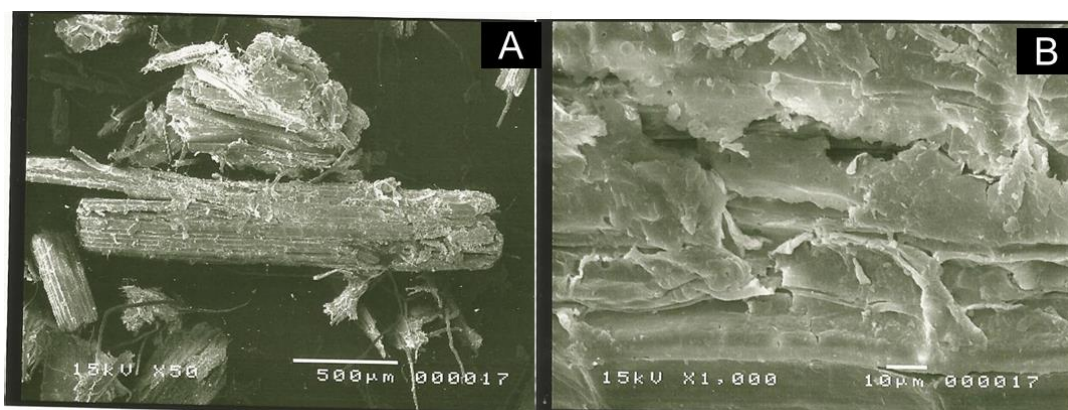


Figura 35. Análise de microscopia eletrônica de varredura IACBIO 1249 (cana energia) após hidrólise enzimática (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).

4.7.6 MEV da biomassa cana energia IACBIO 1230 in natura, após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática

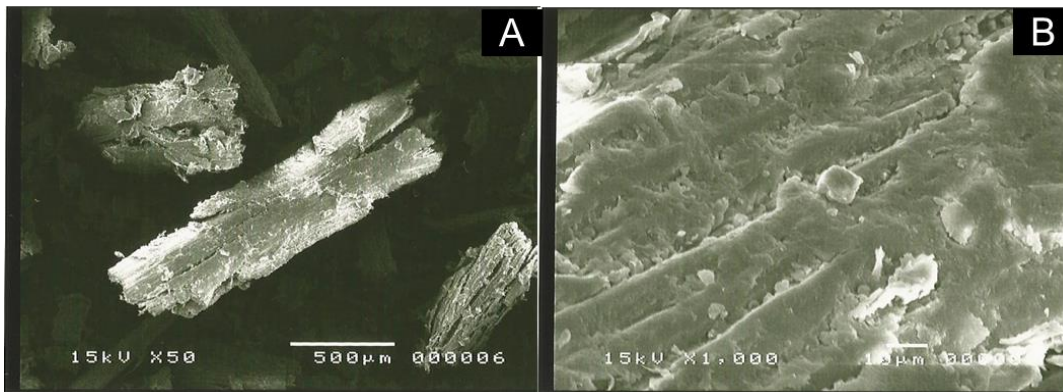


Figura 36. Análise de microscopia eletrônica de varredura IACBIO 1230 (cana energia) in natura (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).

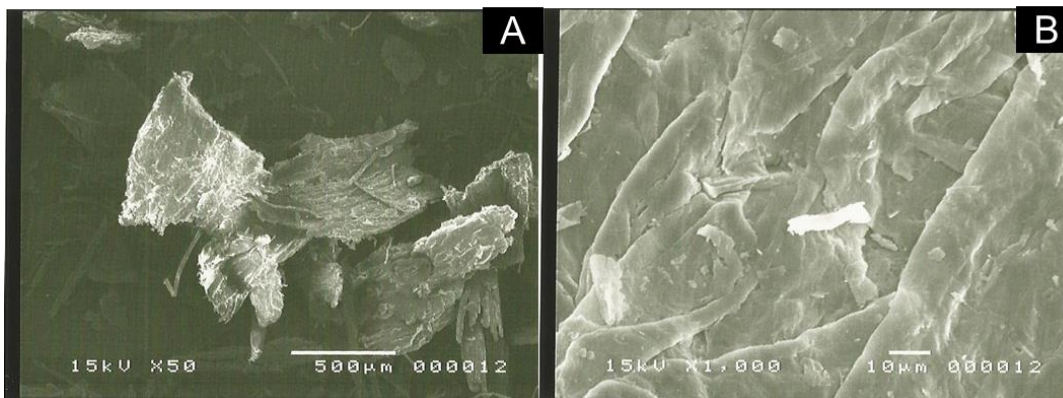


Figura 37. Análise de microscopia eletrônica de varredura IACBIO 1230 (cana energia) pré-tratada (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).

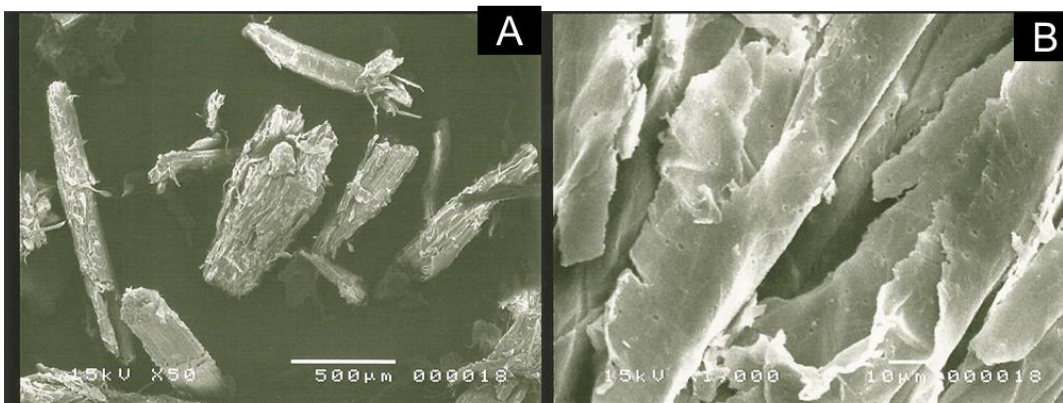


Figura 38. Análise de microscopia eletrônica de varredura IACBIO 1230 (cana energia) pré-tratada (A – aumento de 50x; B – aumento 1000x).

O bagaço, a palha e os clones de cana energia em sua forma in natura apresentam estruturas rígidas com fibras ordenadas. O que é possível visualizar através das imagens são os materiais após passarem por moinho de facas. A superfície compacta e pouco porosa dos materiais in natura, dificulta o acesso às enzimas para a quebra da celulose.

Para facilitar o processo de hidrólise foi realizado um pré-tratamento com ácido diluído, sendo suas imagens obtidas através do MEV avaliadas ao longo desta pesquisa.

Após o pré-tratamento, verificou-se fragmentação da estrutura morfológica do material lignocelulósico, preservado em grande parte, pois, embora o pré-tratamento tenha proporcionado uma abertura na estrutura morfológica dos materiais estudados, boa parte do material permaneceu intacto, dificultando a acessibilidade de reagentes químicos ou biológicos.

Foi possível observar pequenas mudanças estruturais no material tratado que se apresentou mais reduzido e desestruturado em relação à sua morfologia original.

A quantidade de ranhuras e a rugosidade das biomassas se tornaram mais acentuadas demonstrando a separação parcial da compacta estrutura lignocelulósica. Por meio das imagens não foi possível perceber diferenças significativas no nível de desestruturação da morfologia entre as biomassas estudadas.

Como o pré-tratamento não remove a lignina, a presença desta não permite a visualização de microfibrilas de celulose desprendidas da matriz. Sendo assim, a desestruturação da parede celular ocorre apenas no nível macro, deixando as microfibrilas intactas, não ocorrendo a desfibrilação das biomassas.

Com relação aos materiais após a hidrólise enzimática, observa-se uma desorganização do material lignocelulósico e as fibras mais desestruturadas. Estas apresentam um desgaste visivelmente superior das fibras quando comparadas com os materiais pré-tratados, indicando que houve maior disponibilidade do material ao tratamento enzimático

5. CONCLUSÕES

As características das estruturas das biomassas estudadas são diferentes quanto a composição lignocelulósica. Após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído há aumento de celulose de 29 a 63%, e 40% para lignina.

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) possibilitaram melhor visão das características das biomassas lignocelulósicas.

Após o processo de concentração e destoxificação do licor, através da levedura *Rhodotorula glutinis*, foi possível a fermentação com rendimento em etanol em torno de 21% para a CTC 4 e as biomassas de cana energia.

O consumo de xilose em 32 horas de fermentação foi em torno de 50% em todos os tratamentos, indicando a possibilidade da produção de maiores quantidades de etanol.

A viabilidade celular, apresentou-se menor para a biomassa de palha de cana. Os maiores resultados verificados para brotamentos foram em 4 e 32 horas de fermentação que ficaram em torno de 17,21%. A viabilidade de brotos manteve-se ao longo de 32 horas de fermentação em 40%.

Na hidrólise enzimática, o maior rendimento na conversão de celulose a glicose foi para a biomassa da variedade CTC 4, que foi 30% maior que o clone de cana energia IACBIO 1230.

Observando-se os teores de Potássio, Magnésio, Zinco, Manganês, Ferro, Nitrogênio e Fósforo os resultados foram inferiores, no tratamento com bagaço de cana, aos valores observados nos tratamentos a partir de cana energia, que apresentaram os melhores rendimentos.

No hidrolisado enzimático, foram observadas pequenas quantidades de nutrientes, indicando a necessidade de suplementação para o processo fermentativo.

Houve aumento em torno de 500 a 1000kcal/Kg para os tratamentos com relação ao poder calorífico dos materiais in natura para os materiais após a hidrólise enzimática.

6. REFERÊNCIAS

ADNEY, B., BAKER, J. Measurement of cellulase activities. **Chemical analysis and testing task – laboratory analytical procedure**. National Renewable Energy Laboratory (NREL), LAP-006, 1996.

AHMEDNA, M.; MARSHALL, W. E.; RAO, R. M. **Surface properties of granular actived carbons from agricultural by-products and their effects on raw sugar decolorization**. *Bioresource Technology*, v. 71, 2000.

ALMEIDA, M.B.B. **Bio-óleo a partir da pirólise rápida, térmica ou catalítica, da palha da cana-de-açúcar e seu co-processamento com gasóleo em craqueamento catalítico**. *Dissertação* (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

ALONSO, W.; LUENGO, C.; MORALES, L.; GARZONE, P; CORNACCHIA, G. **Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels**. Part 1: Current situation and Environmental Aspects. *Waste Biomass Valor*, v. 2, p. 1 – 16. 2010.

AMORIM, H. V. de; **Fermentação alcoólica, ciência & tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. 448 p.

AMORIM, H.; BASSO, L.; ALVES D. G. **Processos de produção de álcool – controle e monitoramento**. FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP: Piracicaba, 1996.

ANDRADE, R. C. R. **Estudo do desenvolvimento e da produtividade lipídica da levedura *Rhodotorula glutinis* NCYC 921 em culturas descontínuas monitorizadas por citometria de fluxo**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologia 2010.

ARRUDA, P.V. **Efeito do glicerol na bioconversão de xilose em xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* FIT20037**. 2007 75f. Dissertação de Mestrado - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

ASSUMPÇÃO, S. M. N. **Pré-tratamento químico combinado do bagaço da cana visando a produção de etanol de segunda geração**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Escola Politécnica, Dissertação (mestrado), Universidade Federal da Bahia 2016.

BABAU, M., C J., ALLOUCHE, Y., LOMBAERT-VALOT, I., FILLAUDEAU, L., URIBELARREA, J. L., MOLINA-JOUE, C. **Towards a microbial production of fatty acids as precursors of biokerosene from glucose and xylose**. *Oil & Gas Science and Technology–Revue d'IFP Energies nouvelles*, 68(5), 899-911, 2013.

BARNETT, A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**, 2nd edn. Cambridge : Cambridge University Press, 1990.

BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.F.D.M.; CAMPOS, A.A.; GALLO, C.R.; AMORIM, H.V. **Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica de cariotipagem**. Congresso Nacional da STAB, 5. Águas de São Pedro, p. 245- 250, 1993.

BUCKERIDGE, M. S.; SILVA, G. B.; CAVALARI, A. A. **Parede Celular**. In: **KERBAUY, G.B. Fisiologia Vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 165-181.

CANETTIERE, E.V. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia UNESP **Obtenção dos parâmetros e estudo cinético da hidrólise ácida dos resíduos florestais de eucalipto**. Guaratinguetá-SP, 146p. 2004.

CASAGRANDE, A. A. **Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. 157p.

CASTELO BRANCO, L. S. **Produção de carotenoides por linhagens do gênero *Rhodotorula* utilizando glicerol como fonte de carbono**, Tese (doutorado), Universidade Federal do Ceará, 2015.

CHANDEL, A. K.; RAJEEV, K.K.; SINGH, A.; KUHAD, R.C. **Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501**. Bioresource Technology, v. 98, n.10, p. 1947-1950, 2007.

CHENG, K.K.; CAI, B.Y.; ZHANG, J.A.; LING, H.Z.; ZHOU, Y.J.; GE, J.P.; XU, J.M. **Sugarcane bagasse hemicelulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process**. Biochemical Engineering Journal, v.38, p.105-109, 2008.

CHIROMITO, E. M. S. **Preparação de placas rígidas de polpa celulósica e de nanofibras de celulose com polímeros acrílicos**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2016.

CONAB - Companhia Nacional De Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar: safra 2016/2017**. Brasília < <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2> > acesso em 01 de dezembro de 2016.

COPERSUCAR. **Manual de controle químico da fabricação de açúcar**. Piracicaba, 1 CD-ROM, 2001.

CORRÊA, L. J. **Estudos de melhorias no processo de hidrólise enzimática de biomassas para produção de etanol**. Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

COSTA, G. H. G., MASSON, I. D. S., FREITA, L. A. D., ROVIERO, J. P., MUTTON, M. J. R. **Use of Moringa oleífera Lamarck leaf extract as sugarcane juice clarifier: effects on clarified juice and sugar.** Food Science and Technology (Campinas), 34(1), 204-209, 2014.

DAI, C.; TAO, J.; XIE, F.; DAI, Y.; ZHAO, M. **Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity.** African Journal of Biotechnology, v. 6, p. 2130-2134, 2007.

DELGADO, A. A.; CESAR, M. A. A. **Elementos de tecnologia e engenharia do açúcar de cana.** v. 2. Zanini: Sertãozinho, 1977.

ESPIRITO SANTO, M. C. **Otimização de estratégias de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração via hidrólise enzimática.** Diss. Universidade de São Paulo, 2014.

FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; GAVA, G.J.C.; MANZONI, C.S.; PENATTI, C.P.; TRIVELIN, P.C.O. **Degradação da palha (15N) de cana-de-açúcar em dois anos consecutivos.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., Ribeirão Preto, 2003. Anais. Ribeirão Preto, Universidade Estadual de São Paulo/Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2003. CD-ROM.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions.** Berlin: Walter de Gruyter, 613p., 1989.

FERREIRA, J. **"Etanol de segunda geração: definição e perspectivas."** *Rev. Conexão Eletrônica. Três Lagoas, MS* 12, 2015.

FOLIN,O;CIOCALTEU,V. **On tyrosine and tryptophane determinations in proteins.** The Journal of Biological Chemistry, v. 73, n.2, p.627-50, 1927.

FONSECA, B.G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis***, 110p, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

FUGITA, T. P. L.; **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana**. Dissertação de mestrado, 70f, 2010 - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2010.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G. **Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid**. Journal of Food Engineering, v.74, 2006, p.78-88.

GAUDERETO, H.; CABRAL, L.; RODRIGUES, F. **Simulation and economic technical analysis of levulinic acid production from sugarcane bagasse**. Engevista, v. 19, n. 1, p. 236-255, 2017.

GERON, L. J. V., MIGUEL, G. Z., AGOSTINHO, A. **Composição química, valor de pH e temperatura do bagaço de cana-de-açúcar in natura e hidrolisado com cal (CaO) conservados em mini silos**. *Revista de Ciências Agro-Ambientais, Alta Floresta*, 8(1), 57-68, 2010.

GRASEL, F. S., STIEHL, A. C. R., BERNARDI, L. P., HERPICH, T. L., BEHRENS, M. C., ANDRADE, J. B., SCHULTZ, J. MANGRICH, A. S. **Inovação em Biorrefinarias I. Produção de Etanol de Segunda Geração a partir de Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum*) e Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum officinarum*)** Rev. Virtual Quim., 9 (1), 2017.

GUIDI, R. H. **Caracterização, classificação e determinação de marcadores genético moleculares de estirpes e leveduras**

contaminantes do processo fermentativo. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agropecuária - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2000.

HAHN-HAGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. **Towards industrial pentose-fermenting yeast strains.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 74; p. 937-953, 2007.

HEIPIEPER, H. J.; WEBER, F. J.; SIKKEMA, J.; KEWEL, H.; DE BONT, J. A. M. **Mechanism of resistance of whole cells to toxic organic solvents.** Trends in Biotechnology, v. 12, p. 409-615, 1994.

HONIG, P. **Princípios de Tecnologia Azucareira.** v.1. Companhia Editorial Continental: Mexico, 1969.

JACKSON, S.; NICOLSON, S.W. **Xylose as a nectar sugar: from biochemistry to ecology.** Comparative Biochemistry and Physiology Part B, v. 131p. 613–620, 2002.

JUNG, H G; FAHEY JR, G C. **Nutritional implications of phenolic monomers and lignin: a review.** Journal of Animal Science, Vol. 57, p. 206-219, 1983.

KIM, S.; HOLTZAPPLE, M. T.; **Bioresour. Technol.** 2006, 97, 583.

KIRK, T K; FARELL, R L. **Enzimatic “Combustion”: The microbial degradation of lignin.** Annual Review of Microbiology. Vol. 41 p. 465-505, 1987.

KOTTER P, CIRIACY M. **Xylose fermentation by Saccharomyces cerevisiae.** Appl Microbiol Biotechnol 38: 776–783, 1993.

KREGER-VAN RIJ, N. **The Yeasts, a Taxonomic Study**, 3rd edn. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1984.

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

LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.; WONG, H.Y. **Rapid determination of yeast viability**. Biotechnology Bioengineering Symposium, n.11, 1981.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 839 p, 2000.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIN, H. V. **Produção de etanol**. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial. (Ed.) São Paulo. 2001, v. 3, p. 1-43.

LIRA, R. C.; NASCIMENTO, M. S.; SILVA, M. J.; ROCHA, G. J. M. **Pré-tratamento em reator semi-piloto de bagaço e palha de cana-de-açúcar e avaliação da hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada**. Resumos Expandidos do I CONICBIO / II CONABIO/VI SIMCBIO (v.2) Universidade Católica de Pernambuco - Recife - PE - Brasil - 11 a 14 de novembro de 2013.

LODDER, J. **The Yeast: a taxonomic study**. Oxford. North Holland Publishing. 1 144-176, 1970.

LORENCINI, P., **Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para a sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2013.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, H.; PRETORIUS, I. S.; **Microbiol. Mol. Biol. R.** 2002, 66, 506.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações.** 2.ed. Piracicaba: Potafos, 319p. 1997.

MARTIN, C.; JONSSON, L.J. **Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p.386–395, 2003.

MARTIN,C.; ALMAZÁN, O.; MARCET, M.; JONSSON, L.J. **A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production.** *International Sugar Journal*, v. 109, p. 1267, 2007.

MARTON, J. M. **Avaliação dos diferentes carvões ativados e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar para a obtenção biotecnológica de xilitol.** 105p, 2002, Dissertação de Mestrado - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2002.

MASSON, I. D. S., COSTA, G. H. G., ROVIERO, J. P., FREITA, L. A. D., MUTTON, M. A., MUTTON, M. J. R. **Bioethanol production from sweet sorghum broth and sugar cane fermentation.** *Ciência Rural*, 45(9), 1695-1700, 2015.

MATSUOKA, S., BRESSIANI, J. A., MACCHERONI, W., FOUTO, I. BIOENERGIA da cana. **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool: tecnologia e perspectivas.** Suprema, Visconde do Rio Branco, 487-517, 2010.

MEDEIROS, R.S. **Efeito da substituição do bagaço de cana-de-açúcar auto-hidrolisado por sorgo na fermentação ruminal em bovinos, digestibilidade in vitro em ovinos e desempenho animal em bovino em acabamento.** 1992. 104p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

MEIGHAN, B. N. **Fracionamento de bagaço de cana-de-açúcar por processo hidrotérmico e organossolve no contexto da biorrefinaria lignocelulósica.** 136f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.

MILLER, G. L. **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.** *Analytical Chemistry*, 31(3):426-428, 1959.

MODING, T., LIDEN, G.; TAHERZADEH, M.J. **Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase.** *Biochemistry Journal*, v.363, p.769–776, 2002.

MOITINHO, M. R., DA SILVA BICALHO, E., TEIXEIRA, D. D. B., PADOVAN, M. P., LA SCALA JR, N. **Efeito da Palha sobre a Emissão de CO₂ do Solo em Áreas de Cana-de-açúcar.** *Cadernos de Agroecologia*, 11(2), 2017.

MORAIS, V. L. M.; ALSINA, O. L. S.; GOMES, W. C. **Utilização do Bagaço de Cana-de-açúcar como Biomassa Adsorvente na Adsorção de Poluentes Orgânicos.** *Revista eletrônica de Materiais e processos*, v. 2, n. 1, 2007.

MORO, M. K. **Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar por extrusão com dupla-rosca.** Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2015. XII, 107 p.: il.; 29,7 cm.

MUÑOZ, F.; QUINTERO, R. **Trash management after green cane harvesting and its effect on productivity and soil respiration.** *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.*, v. 27, p. 1 – 8, 2009.

MUSSATO, I.S.; ROBERTO, I.C. **Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review.** *Bioresource Technology*, v.93, p.1-10, 2004.

MUTTON, M. J. R. **Avaliação da fermentação etanólica do caldo de cana-deaçúcar (*Saccharum spp*) tratada com maturadores químicos.** 1998. 178 f Tese (Livre-Docência), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

NARCISO, G. V.; SIMIONATO, K. P.; ARRUDA, P. V.; SENE, L.; FELIPE, M. G. A. **Palha de Sorgo: Biomassa Lignocelulósica Potencial para Utilização em Bioprocessos que envolvem o Aproveitamento da Fração Hemicelulósica.** In: SINAFERM – SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2009, Natal. Anais, Rio Grande do Norte: UFRN, 2009.

NARENDRANATH, N.V.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. **Effects of acetic acid ad lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 26, p.71-177, 2001.

NEUREITER, M., DANNER, H., THOMASSER, C., SAIDI, B., BRAUN, R., **Dilute acid hydrolysis of sugar cane bagasse at varying conditions.** *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98, 49–58, 2002.

NISHIYAMA, Y.; LANGAN P.; CHANZY H. **Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction.** *Journal of the American Chemical Society*, 2002.

OKUNO, F. M.; **Desempenho econômico de um sistema de produção de biomassa da cana energia.** 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Sistemas Agrícolas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, niversity of São Paulo, Piracicaba, 2016.

OLIVÉRIO, J. L.; HILST, A. G. P. **DhrDedini hidrólise rápida – Revolutionary process for producing alcohol from sugar cane bagasse.** XXV International Society of Sugar Cane Technologists Congress, Guatemala, 2005.

PALMQVIST,E.; HAHN-HAGERDAL, B. **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification.** Bioresource Technology, 74, p.17-24, 2000.

PAOLIELLO, J. M. M. **Aspectos Ambientais e Potencial Energético no Aproveitamento de Resíduos da Indústria Sucroalcooleira.** 200 p. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia da Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2008.

PEREIRA, L.T.C., BON, E.P.S, TEIXEIRA, R.S.S., PEREIRA, L.T.C, FREITAS, S.P. **Sugarcane bagasse enzymatic hydrolysis: rheological as criteria for impeller selection.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 38:901-907, 2011.

PITARELO, A.P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática.** Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PITKÄNEN, A., HUTTUNEN, P., JUNGNER, H., MERILAINEN, J. AND TOLONEN, K., **Holocene fire history of middle boreal pine forest sites in eastern Finland.** Annales Botanici Fennici 40: 15-33, 2003.

RABELO, S. C. **Avaliação de Desempenho do Pré-tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino para a Hidrólise Enzimática de Bagaço de cana-de-açúcar.** 180f, 2007, Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2007.

RABELO, S.; CARRERE, H.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. **Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept.** *Bior. Tech.*, v. 102, p. 7887– 7895. 2011.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo.** 2a. ed. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundação IAC, 1996. p. 237-239.

RAIJ, B.van., **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes.** Campinas, Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2011. 420p.

RANATUNGA, T. D., JERVIS, J., HELM, R. F., MCMILLAN, J. D., HATZIS, C.. **Toxicity of hardwood extractives toward *Saccharomyces cerevisiae* glucose fermentation.** *Biotechnology letters*, 19(11), 1125-1127, 1997.

RIPOLI, T. C. C; RIPOLI, M. L. C. **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente.** 2. ed. Piracicaba: T. C. C. Ripoli, 2007, 310 p.

ROCCO, C. D. **Um modelo de otimização para as operações de produção de vapor em caldeiras industriais: um estudo de caso na indústria de alimentos.** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia de Produção), São Carlos, 2011, 99p.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; VINÍCIUS F. N. DA SILVA; EDGARDO G. OLIVAREZ; ADILSON R. GONÇALVES. **Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by**

alkaline delignification. *Bioresource Technology*, v. 111, p. 447-452, 2012.

ROVIERO, J. P., ARRUDA, P. V. D., DE ALMEIDA FELIPE, M. D. G., MUTTON, M. J. R. **Ethanol production using hemicellulosic hydrolyzate and sugarcane juice with yeasts that converts pentoses and hexoses.** *African Journal of Biotechnology*, 14(6), 519-524, 2015.

SAHA, B. C. **Hemicellulose bioconversion.** *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, v. 30, p. 279-291, 2003.

SALCEDO, J.; LÓPEZ, J.; FLÓREZ, L. **Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha de caña de azúcar.** *Dyna.*, v. 78, v. 169, p. 182 – 190, 2011.

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*, São Paulo, v. 35, n. 5, 2012.

SANTOS, R. A. **Estudo cinético de fermentação etanólica do hidrolisado de farinha de mandioca utilizando complementação nutricional do mosto.** 102 f. Dissertação – Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.

SCHIRMER-MICHEL, A. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, F.; MATOS, G. S.; AYUB, M. A. **Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075.** *Bioresource Technology*, v. 99, p. 2898–2904, 2008.

SHEN J., WYMAN C.E. **Hydrochloric acid-catalyzed levulinic acid formation from cellulose: data and kinetic model to maximize yields,** *AIChE J.*, Volume 58, p 236–246, 2012.

SILVA NETTO, E. F.; 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.

SILVA, F. DE A. S. E AZEVEDO, C. A. V. DE. **Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78,2002.

SILVA, M. G. E. da SILVA JÚNIOR, J. L. da PINTO JÚNIOR, C. R. T. **Produção de Etanol de Segunda Geração: Uma Revisão**. Revista Científica da UNIFAE, São João da Boa Vista, v.4, n.2, 2010.

SILVA, V. F. **Estudos de pre-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo. 116p. 2009.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry. Fundamentals and applications**. 2. ed. Califórnia: Academic Press, 1993. 293 p.

SLUITER, J. B.; CHUM, H. ; GOMES, A. C. ; TAVARES, R.A P. ; AZEVEDO, V. ; PIMENTA, M.T.B. ; RABELO, S.C. ; MARABEZI, K. ; CURVELO, A. A. S. ; ALVES, A. R. ; GARCIA, W. T. ; CARVALHO, W. ; ESTEVES, P. J. ; MENDONÇA, S. ; OLIVEIRA, P. A. ; RIBEIRO, J. A. A. ; MENDES, T. D. ; VICENTIN, M. P. ; DUARTE, C. L. ; MORI, M. N. . **Evaluation of Brazilian Sugarcane Bagasse Characterization: An Interlaboratory Comparison Study**. Journal of AOAC International, p. 7, 2016.

SOARES, P. A., ROSSELL, C. E. V.; **Conversão da Celulose pela tecnologia Organosolv NAIPPE/USP**: São Paulo, 2004.

SOUZA, Z. J.; AZEVEDO, P. F. **Geração de energia elétrica excedente no setor sucroalcooleiro: um estudo a partir das usinas paulistas.** Rev. Econ. Sociol. Rural, Brasília, v. 44, n. 2, 2006.

SOUZA, Z.J.; AZEVEDO, P.F. **Geração de energia elétrica excedente no setor sucroalcooleiro: um estudo a partir das usinas paulistas.** RER, Rio de Janeiro, v. 44, n. 02, p. 179-199, 2006.

STUPIELLO, J.P.; HORI., J. **Condução da fermentação alcoólica.** Saccharum, v. 17, p.43-46, 1981.

TAHERZADEH, M e KARIMI, K. **Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review.** International Journal of Molecular Sciences, Vol. 9, p. 1621-1651, 2008.

TEIXEIRA, T. S.; SIQUEIRA, F. G.; BATISTA, R. D. **Enzimas microbianas de desconstrução da parede celular: novas abordagens.** Revista Eletrônica de Energia, v. 6, n. 1, 2017.

TEODORO, J. C.; ANDRADE, L. P.; GODOY NETO, O.; RAMOS, L. P; KNUDSEN, B. R.; GALVÃO, C. M. A.; **Aproveitamento de Bagaço e Palha de Cana-de-Açúcar para Produção de Etanol Celulósico a partir de Fermentações em Batelada Alimentada,** XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul, RS, 2011.

TRIVELIN, P.C.O.; SALATI, E.; MATSUI, E. **Preparo de amostras para análise de 15N por espectrometria de massa** (Boletim Técnico, 2). Piracicaba, CENA, 1973. 41p.

UDOP. **União dos Produtores de Bioenergia.** Disponível em: <http://www.udop.com.br>. Acesso em: 13.nov. 2016.

WALKER, G.M. **Yeast Physiology and Biotechnology.** England: John Wiley, p.157-158 e p.350,1998.

WALKER, J R L. **The Biology of Plant Phenolics. Studies in biology**, Londres, Vol. 54, p. 1-57, 1975.

WANDERLEY, M.C.A., MARTÍN, C., ROCHA, G.J.M. - **Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fedbatch enzymatic hydrolysis.** *Bioresource Technology*, 128:448–453, 2013.