

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 03/02/2019.

**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.

2017

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

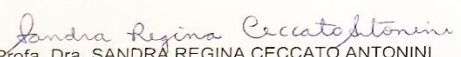
AUTORA: JULIANA PELEGRINI ROVIERO
ORIENTADORA: MARCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON
COORIENTADORA: SARITA CANDIDA RABELO

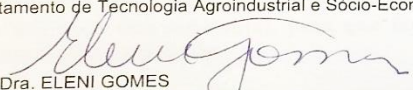
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em
MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


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.

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-JOUVE, 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.

CANETTIÈRE, 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.