

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

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO
UTILIZANDO BAGAÇO DE SORGO SACARINO,
FORRAGEIRO E BIOMASSA**

Lidyane Aline de Freitas

Bióloga

2017

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

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO
UTILIZANDO BAGAÇO DE SORGO SACARINO,
FORRAGEIRO E BIOMASSA**

Lidyane Aline de Freitas

**Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton
Coorientadora: 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

F862p Freita, Lidyane Aline

Produção de Etanol de Segunda Geração Utilizando Bagaço de Sorgo Sacarino, Forrageiro e Biomassa / Lidyane Aline de Freita. - Jaboticabal, 2017
xiii, 179 p.: il.; 28 cm

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Márcia Justino Rossini Mutton
Coorientadora: Sarita Cândida Rabelo
Banca examinadora: Sandra Regina Cecatto Antonini, Leonardo Lucas Madaleno, Raúl Andres Martinez Uribe, Carlos Eduardo Vaz Rossel

Bibliografia

1. *Sorghum bicolor*. 2. Pré-tratamento. 3. *Pichia kudriavzevii*. 4. Hidrólise enzimática; 5. Hidrolisado ácido. 6. Bioenergia.

I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8..663.5

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

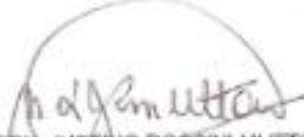


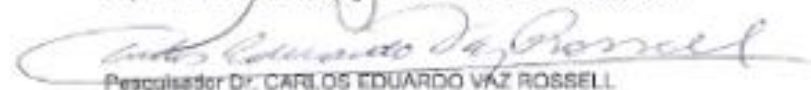
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

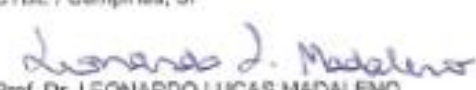
TÍTULO: PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO UTILIZANDO BAGAÇO DE SORGO SACARINO, FORRAGEIRO E BIOMASSA


AUTORA: LIDYANE ALINE DE FREITA
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 VÁZ ROSSELL
CTBE / Campinas, SP


Prof. Dr. LEONARDO LUCAS MADALENO
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP


Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI
CCA/UFSCAR / Araras, SP


Prof. Dr. RAUL SOARES MARTINEZ URIBE
FCE / UNESP - Tupã, SP

Jaboticabal, 20 de março de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LIDYANE ALINE DE FREITA - nasceu aos 29 de Janeiro de 1986, na cidade de Araraquara, estado de São Paulo. Em Fevereiro de 2005 ingressou no curso de Ciências- Licenciatura Plena na Faculdade Centro Universitário “Barão de Mauá”, recebendo o título de Bióloga em Dezembro de 2010. A partir de setembro de 2005 passou a integrar os grupos de pesquisa “Processos Biotecnológicos Aplicados á Agroindústria” e “Fisiologia e Manejo Sustentável da Cana-de-açúcar”, participando de diversos projetos. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária), em nível de mestrado da FCAV – UNESP, obtendo o título de Mestre em fevereiro de 2013. Neste mesmo período ingressou no programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, em nível de doutorado da FCAV – UNESP, logrando o título de doutora em Microbiologia Agropecuária em março de 2017.

Epígrafe

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
volta a seu tamanho original”.

Albert Einstein

A minha família, meu espelho e minha alegria de viver - amados pais Mauro e Célia, querida irmã Cristhyane e amado namorado Matheus, obrigada por todo o amor, confiança e dedicação. Minha eterna gratidão por tudo que fazem e fizeram por mim, agradeço a Deus todos os dias por estar nessa família. Amo muito vocês!

Dedico.

A minha querida orientadora e coorientadora, **Professora Dra. Márcia J. R. Mutton** e **Dra. Sarita Cândida Rabelo** que foram capazes de me fazer trilhar por um crescimento profissional que julgava impossível em tão pouco tempo. O vosso brilhantismo acadêmico e altruísmo à pesquisa compuseram uma somatória fundamental não só para a construção do pensamento que se traduz nas páginas deste longo texto, mas como para a maturidade de toda uma vida a seguir: antes de tudo, este momento se dedica a estas grandes mestras com carinho.

Ao Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton, pelo carinho, pela atenção, pelos conselhos e ensinamentos. Agradeço imensamente por estar presente nesta etapa da minha vida

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ter-me iluminado e guiado na minha trajetória;

Aos meus pais, irmã e namorado por todo carinho, apoio, incentivo e colo nas horas mais difíceis.

A Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton e ao Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton, pela oportunidade, orientação e ensinamentos para minha vida profissional e pessoal;

A Dra. Sarita Cândida Rabelo pela oportunidade que me deu, por tudo que aprendi com você e graças a você, obrigada pela paciência e carinho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal pela oportunidade de crescimento como ser humano e profissional.

Ao Programa de Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP) pela oportunidade de realizar o curso de doutorado;

A Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro pelo carinho, pela atenção, pelos conselhos e ensinamentos.

Ao CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Biotanol) pela concessão de suas instalações para realização das análises. Pela equipe do CTBE, que me recebeu com muito carinho e atenção, me ajudou e me apoiou em todo o momento, em especial pela amizade da Daniele Cristina Joaquim Santoro, Edilaine de Melo Ferreira Tenório e Tatiane Tarley Pereira.

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.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo;

A equipe do Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Álcool: Aline, Cristhyane, Franciele, Gustavo, Vitor, Juliana, Karen, Letícia, Marcel, Matheus, Nathieli, Nayara, Osania, Sérgio e Welton, por toda ajuda e amizade.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização desse estudo.

SUMÁRIO

| | |
|---|--------------------------------------|
| RESUMO..... | iv |
| ABSTRACT. | Erro! Indicador não definido. |
| LISTA DE FIGURAS..... | vi |
| LISTA DE TABELAS..... | xii |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 16 |
| 2.1 Sorgo- Aspectos gerais da cultura | 16 |
| 2.1.2 Fenologia do Sorgo | 17 |
| 2.1.2.1 Tipos comerciais de sorgo..... | 19 |
| 2.1.2.2 Sorgo Granífero..... | 19 |
| 2.1.2.3 Sorgo Forrageiro | 20 |
| 2.1.2.4 Sorgo Sacarino..... | 21 |
| 2.1.2.5 Sorgo Biomassa | 23 |
| 2.1.2.6 Sorgo Vassoura..... | 24 |
| 2.2 Macro e micronutrientes nas plantas | 24 |
| 2.3 Produção de Biocombustíveis de Primeira e Segunda Geração | 27 |
| 2.4 Biomassas Lignocelulósicas | 29 |
| 2.4.1 Celulose | 30 |
| 2.4.2 Hemiceluloses | 33 |
| 2.4.3 Lignina..... | 35 |
| 2.4.4 Pectinas..... | 39 |
| 2.4.5 Outros Compostos | 39 |
| 2.5 Produção de Etanol a Partir de Materiais Lignocelulósicos..... | 40 |
| 2.5.1 Produção de Enzimas | 43 |
| 2.5.2 Pré-tratamento | 44 |
| 2.5.2.1 Tipos de Pré-tratamento..... | 46 |
| 2.5.2.2 Pré-tratamento com ácido diluído..... | 46 |
| 2.5.2.3 Formação de inibidores | 47 |
| 2.5.3 Hidrólise Enzimática | 49 |
| 2.5.3.1 As enzimas Celulases | 50 |
| 2.5.3.2 Principais fatores que afetam a hidrólise enzimática..... | 53 |

| | |
|--|----|
| 2.6 Processos de fermentação dos materiais lignocelulósicos | 54 |
| 2.6.1 Leveduras fermentoras de pentoses e hexoses | 56 |
| 2.7 Perspectivas da Produção de Etanol Celulósico no Brasil | 61 |
| 3.0 MATERIAL E MÉTODOS | 63 |
| 3.1 Sorgo..... | 63 |
| 3.2 Condições do teste preliminar do pré-tratamento..... | 64 |
| 3.2.1 Scaling up do processo | 65 |
| 3.2.2 Concentração e destoxificação do hidrolisado hemicelulósico | 66 |
| 3.2.3 Isolamento da levedura | 67 |
| 3.2.4 Purificação..... | 67 |
| 3.2.5 Teste de crescimento em diferentes temperaturas | 68 |
| 3.2.6 Assimilação de fontes de carbono | 68 |
| 3.2.6.1 Meio de inoculação preliminar | 68 |
| 3.2.6.2 Meio de assimilação de fonte de carbono | 69 |
| 3.2.6.3 Identificação da levedura fermentadora | 70 |
| 3.2.6.4 Reativação das culturas e crescimento de massa celular..... | 71 |
| 3.3 Fermentação da fração C5 (pentoses) | 71 |
| 3.4 Hidrólise enzimática..... | 72 |
| 3.4.1 Determinação da atividade enzimática..... | 72 |
| 3.4.2 Hidrólise enzimática | 72 |
| 3.4.3 Fermentação da fração C6..... | 73 |
| 3.5 Métodos analíticos | 74 |
| 3.5.1 Análises químicas das biomassas..... | 74 |
| 3.6 Determinação de carboidratos, aldeídos furânicos, ácidos orgânicos e produtos fermentativos por HPLC | 75 |
| 3.7 Determinações de macro e micronutrientes | 76 |
| 3.8 Determinação do valor energético bruto..... | 76 |
| 3.9 Microscopia eletrônica de varredura | 77 |
| 3.10 Análise Estatística | 78 |
| 4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 79 |
| 4.1 Composição química das biomassas <i>in natura</i> | 79 |
| 4.2 Características morfológicas dos bagaços de sorgo..... | 80 |
| 4.3 Screening das condições de pré-tratamento | 84 |

| | |
|---|-----|
| 4.4 Identificação, caracterização e classificação da levedura | 90 |
| 4.5 Fermentação de pentoses | 93 |
| 4.5.1 Viabilidade Celular | 97 |
| 4.5.2 Produção de Etanol e subprodutos | 99 |
| 4.6 Hidrólise enzimática..... | 103 |
| 4.6.1 Atividade enzimática | 104 |
| 4.6.2 Perfil de Hidrólise Enzimática | 106 |
| 4.7 Fermentação hidrolisado enzimático | 108 |
| 4.7.1 Viabilidade Celular | 112 |
| 4.7.2 Produção de Etanol e subprodutos | 116 |
| 4.8 Produtividade..... | 118 |
| 4.9 Nutrientes | 122 |
| 4.9 Poder calorífico dos resíduos..... | 130 |
| 5.0 CONCLUSÕES | 134 |
| 6. REFERÊNCIAS | 136 |
| Apêndices..... | 160 |
| Apêndice I – Determinação de Extrativos | 160 |
| Apêndice II | 164 |

PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO UTILIZANDO BAGAÇO DE SORGO SACARINO, FORRAGEIRO E BIOMASSA

RESUMO – O etanol de cana-de-açúcar vive uma crise devido, principalmente, a não expansão dos processos fermentativos que terminam por depender de apenas uma fonte e que ainda apresenta o agravante de ter que ser segregado à produção de açúcar. Desta forma, o sorgo surge como cultura energética, como matéria-prima para produção de etanol, tanto do ponto de vista agrônômico quanto industrial. O sorgo apresenta colmos ricos em açúcares fermentáveis, semelhantes à cana-de-açúcar. Objetivou-se com a presente pesquisa avaliar a potencialidade de 3 genótipos de sorgo (sacarino, forrageiro e biomassa) para produção de etanol 2G, com ênfase na caracterização do bagaço antes e após pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática, e na fermentação dos hidrolisados por duas leveduras, sendo a LJ3, fermentando as pentoses e as hexoses com *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2). Avaliou-se a composição dos bagaços dos 3 genótipos de sorgo em relação aos nutrientes, além da análise de microscopia eletrônica para visualização das biomassas após os tratamentos realizados. Os resultados evidenciaram a eficiência do pré-tratamento e da hidrólise enzimática possibilitando a recuperação dos açúcares presentes no bagaço de sorgo para composição do mosto a ser fermentado; a cepa LJ03 foi classificada como *Pichia kudriavzevii*, que apresentou habilidade para metabolizar pentoses e hexoses a etanol. A hidrólise enzimática foi eficiente e possibilitou a produção de 11,83; 12,28 e 7,79g etanol/kg bagaço m.s., para os genótipos sacarino, forrageiro e biomassa, respectivamente empregando a levedura PE-2. Observou-se nas análises de nutrientes dos bagaços dos diferentes genótipos de sorgo, que estes reduziram significativamente das biomassas *in natura*, para biomassa pré-tratada e após hidrólise enzimática. O poder calorífico (PCS, PCI e PCU) dos resíduos gerados na produção de etanol 2G, foi de 3811; 3902 e 3953Kcal.kg⁻¹ respectivamente para o sorgo sacarino, forrageiro e biomassa. Para a produção de etanol 2G obteve-se rendimento total de 59,38; 45,33 e 25,53 litros de etanol.t⁻¹ de massa seca respectivamente, e produção de 1.301,48, 964,82 e 805,52 litros de etanol/ha, respectivamente. O genótipo BRS508 (sacarino) foi o que apresentou maior produção de etanol de segunda geração em comparação aos BRS610 (forrageiro) e BD7605 (Biomassa).

Palavras-chave: *Sorghum bicolor*; Pré-tratamento; *Pichia kudriavzevii*; Hidrólise enzimática; Hidrolisado ácido; Bioenergia.

PRODUCTION OF SECOND GENERATION ETHANOL USING SWEET, FORAGE AND BIOMASS SORGHUM BAGASSE

ABSTRACT- Sugarcane ethanol is experiencing a crisis, mainly due to the non-expansion of the fermentation processes that end up depending on only one source that still presents the aggravating factor of having to be segregated to the sugar production. In this context, sorghum emerges as an energy crop, as a raw material for the ethanol production, both from an agronomic and industrial point of view. Sorghum has stalks rich in fermentable sugars, similar to sugarcane. The objective of this research was to evaluate the potentiality of 3 genotypes of sorghum (sweet, forage and biomass) for the production of 2G ethanol, with emphasis on the characterization of bagasse before and after acid pretreatment and enzymatic hydrolysis, and in the fermentation of the hydrolysates by two yeasts, the LJ3 fermenting pentoses and *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) fermenting hexoses. The composition of the three sorghum genotypes in relation to the nutrients was evaluated, as well as the analysis of electron microscopy to visualize the biomass after the treatments. The results evidenced the efficiency of the pretreatment and the enzymatic hydrolysis allowing the recovery of the sugars present in the sorghum bagasse for the composition of the must to be fermented. The LJ03 strain was classified as *Pichia kudriavzevii*, which showed ability to metabolize pentoses and hexoses to produce ethanol. The enzymatic hydrolysis was efficient and allowed the production of 11.83; 12.28 and 7.79g ethanol/kg bagasse, for the sweet, forage and biomass genotypes, respectively, employing yeast PE-2. It was observed in the nutrient analysis of the bagasse of the different sorghum genotypes, that nutrients reduced significantly of the *in natura* biomasses, for pretreated biomass and after enzymatic hydrolysis. The calorific value (HHV, LHV, and UHV) of the waste generated in the 2G ethanol production was 3811; 3902 and 3953Kcal.kg⁻¹, respectively, for sweet, forage and biomass sorghum. The production of 2G ethanol there was a total yield of 59.38; 45.33 and 25.53 liters of ethanol.t⁻¹ of dry mass, respectively, and production of 1301.48, 964.82 and 805.52 liters of ethanol/ha, respectively. The BRS508 (sweet) genotype showed the highest production of second generation ethanol compared to BRS610 (forage) and BD7605 (biomass).

Index terms: *Sorghum bicolor*; pretreatment, *Pichia kudriavzevii*, enzymatic hydrolysis; acid hydrolysis; bioenergy.

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 01. Sorgo- Estágios de crescimento da emergência á maturação..... | 20 |
| Figura 02. Sorgo granífero..... | 21 |
| Figura 03. Sorgo forrageiro..... | 22 |
| Figura 04. Sorgo sacarino..... | 23 |
| Figura 05. Sorgo biomassa..... | 24 |
| Figura 06. Sorgo vassoura..... | 25 |
| Figura 07. Modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico (parede secundária)..... | 30 |
| Figura 08. Estrutura molecular do polímero natural celulose e da sua unidade monomérica celobiose..... | 32 |
| Figura 08.1. (A) Rede de microfibrilas de celulose contendo regiões cristalinas intercaladas por regiões amorfas e (B) estrutura molecular parcial da hemicelulose tendo como unidades repetitivas o monômero de glicose e o dímero de glicose que é a unidade de celobiose..... | 33 |
| Figura 09. Estrutura molecular parcial da hemicelulose..... | 34 |
| Figura 10. Representações de unidade de polissacarídeos presentes na hemicelulose: (1) β -D-Xylose, (2) α -L-Arabinopyranose, (3) α -L-Arabinoforano, (4) β -D-Glucose, (5) β -D-Manose, (6) α -D-Galactose, (7) β -D-Ácido Glucurônico, (8) α -D-4-O-Ácido methylglucuronic, (9) α -D-Ácido galactose, (10) α -L-Ramnose e (11) α -L-Fucose..... | 35 |
| Figura 11. Precursores primários da lignina: a) álcool trans-p-cumarílico; b) álcool trans-coniferílico e c) álcool trans-sinapílico..... | 37 |
| Figura 12. Principais unidades aromáticas presente na molécula de lignina: (a) p-hidroxifenila; (b) Guaiacila; (c) Siringila..... | 38 |
| Figura 13. Estrutura parcial hipotética de lignina..... | 39 |
| Figura 14. Estrutura geral da pectina..... | 40 |
| Figura 15. Estrutura hierárquica de um tecido vegetal..... | 42 |
| Figura 16. Representação esquemática dos níveis que precedem a formação de uma microfibrila presentes em plantas superiores. (a) seção transversal da | |

| | |
|--|----|
| estrutura formada pelas 6 cadeias de celulose na subunidade dos complexos específicos terminais. Cada retângulo cinza representa uma cadeia de celulose. (b) seção transversal das fibras elementares; (c) seção transversal das microfibrilas de celulose composta de 6 fibrilas elementares; (d) seção lateral das microfibrilas mostrando a configuração em série de regiões cristalinas e amorfas..... | 43 |
| Figura 17. Estrutura hierárquica da constituição de uma macrofibrila..... | 44 |
| Figura 18. Pré-tratamento em materiais lignocelulósicos..... | 46 |
| Figura 19. Formação dos componentes inibitórios..... | 49 |
| Figura 20. Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose..... | 51 |
| Figura 21. Rotas de hidrólise e fermentação..... | 56 |
| Figura 22. Esquema simplificado do metabolismo de xilose até etanol por leveduras..... | 58 |
| Figura 23. Reações bioquímicas da via glicolítica em leveduras..... | 60 |
| Figura 24. Reações bioquímicas da via glicolítica em leveduras indicando a formação de subprodutos..... | 62 |
| Figura 25. Tubos de ensaio contendo meio para teste de crescimento em diferentes temperaturas (A: resultado positivo; B: resultado negativo)..... | 69 |
| Figura 26. Teste de assimilação de fonte de carbono (A: crescimento negativo; B: crescimento moderado ou lento; C: crescimento intenso)..... | 71 |
| Figura 27. Reator aço inoxidável com capacidade de 7L, com agitação 23,5Hz e temperatura a 50°C, por 72 horas..... | 74 |
| Figura 28. Metalização das amostras com ouro paládio através do equipamento DESK II - DENTON VACUM (A). Visualização microscópica das amostras através do equipamento JOEL- JSM5410 (B)..... | 79 |
| Figura 29. Fotomicrografias do bagaço de sorgo BRS508 “in natura” (A – aumento de 50x; B – aumento de 1000x); pre-tratado (C – aumento de 50x; D – aumento de 1000x) e após hidrólise enzimática (E – aumento de 50x; F – aumento de 1000x)..... | 82 |
| Figura 30. Fotomicrografias do bagaço de sorgo BRS610 “in natura” (A – aumento de 50x; B – aumento de 1000x); pre-tratado (C – aumento de 50x; D | |

| | |
|--|----|
| – aumento de 1000x) e após hidrólise enzimática (E – aumento de 50x; F – aumento de 1000x)..... | 83 |
| Figura 31. Fotomicrografias do bagaço de sorgo BD7605 “in natura” (A – aumento de 50x; B – aumento de 1000x); pre-tratado (C – aumento de 50x; D – aumento de 1000x) e após hidrólise enzimática (E – aumento de 50x; F – aumento de 1000x)..... | 84 |
| Figura 32. Concentração das médias dos açúcares de cinco carbonos..... | 87 |
| Figura 33. Concentração das médias dos açúcares de seis carbonos..... | 88 |
| Figura 34. Concentração das médias de ácido acético..... | 89 |
| Figura 35. Fotografia de colônias da levedura LJ3, em meio GYMP, após 72 horas de incubação, a 30°C..... | 91 |
| Figura 36. Desdobramento de xilose ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam tempos de fermentação. Letras maiúsculas comparam genótipos de sorgo..... | 95 |
| Figura 37. Desdobramento de arabinose ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam genótipos de sorgo..... | 96 |
| Figura 38. Desdobramento de glicose ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo..... | 97 |
| Figura 39. Viabilidade celular. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e biomassa (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo..... | 98 |
| Figura 40. Viabilidade de brotos. Interação entre genótipos de sorgo sacarino | |

| | |
|---|-----|
| (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo..... | 99 |
| Figura 41. Índice de brotamento da levedura durante o período de 72hs, em mosto sintético e pre-tratado de bagaço de sorgo..... | 100 |
| Figura 42. Produção de Etanol ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo..... | 101 |
| Figura 43. Produção de Ácido Acético ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo..... | 102 |
| Figura 44. Produção de Glicerol ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo..... | 104 |
| Figura 45. Representação gráfica da atividade da enzima celuclast 1.5L..... | 106 |
| Figura 46. Perfil da hidrolise enzimática genótipo BRS508..... | 107 |
| Figura 47. Perfil da hidrolise enzimática genótipo BRS610..... | 108 |
| Figura 48. Perfil da hidrolise enzimática genótipo BD7605..... | 108 |
| Figura 49. Desdobramento de glicose ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo..... | 110 |
| Figura 50. Desdobramento de celobiose ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e | |

| | |
|---|-----|
| energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam tempos de fermentação. Letras maiúsculas comparam genótipos de sorgo..... | 111 |
| Figura 51. Desdobramento de arabinose ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam tempos de fermentação. Letras maiúsculas comparam genótipos de sorgo..... | 112 |
| Figura 52. Comparação entre os genótipos do consumo de xilose pela levedura PE-2..... | 113 |
| Figura 53. Comparação entre o tempo do consumo de xilose pela levedura PE-2..... | 113 |
| Figura 54. Viabilidade celular. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam tempos de fermentação. Letras maiúsculas comparam genótipos de sorgo..... | 114 |
| Figura 55. Brotamento. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam tempos de fermentação. Letras maiúsculas comparam genótipos de sorgo..... | 115 |
| Figura 56. Índice de viabilidade de brotos da levedura PE-2 durante o período de 24hs, em mosto hidrolisado enzimático de bagaço de sorgo..... | 116 |
| Figura 57. Índice de viabilidade de brotos da levedura PE-2 entre os genótipos de sorgo, em mosto hidrolisado enzimático de bagaço..... | 116 |
| Figura 58. Produção de Etanol ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam tempos de fermentação. Letras maiúsculas comparam genótipos de sorgo..... | 117 |
| Figura 59. Produção de Ácido Acético ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam tempos de fermentação. Letras maiúsculas comparam genótipos de sorgo..... | 118 |
| Figura 60. Produção de Glicerol ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia | |

| | |
|---|-----|
| (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam tempos de fermentação. Letras maiúsculas comparam genótipos de sorgo..... | 119 |
| Figura 61. Resultados médios obtidos para os Teores de Nitrogênio, para os bagaços dos genótipos: BRS508, BRS610 e BD7605: In natura, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática..... | 124 |
| Figura 62. Resultados médios obtidos para os Teores de Potássio, para os bagaços dos genótipos: BRS508, BRS610 e BD7605: In natura, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática..... | 125 |
| Figura 63. Resultados médios obtidos para os Teores de Cálcio, para os bagaços dos genótipos: BRS508, BRS610 e BD7605: In natura, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática..... | 126 |
| Figura 64. Resultados médios obtidos para o Teor de Magnésio, para o bagaço do sorgo BRS508: In natura, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática... | 127 |
| Figura 65. Resultados médios obtidos para o Teor de Magnésio, para o bagaço do sorgo BRS610: In natura, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática... | 127 |
| Figura 66. Resultados médios obtidos para o Teor de Magnésio, para o bagaço do sorgo BD7605: In natura, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática.... | 128 |
| Figura 67. Resultados médios obtidos para o Teor de Zinco, para o bagaço do sorgo sacarino: In natura, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática..... | 129 |
| Figura 68. Resultados médios obtidos para o Teor de Zinco, para o bagaço do sorgo forrageiro: In natura, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática..... | 129 |
| Figura 69. Resultados médios obtidos para o Teor de Zinco, para o bagaço do sorgo biomassa: In natura, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática..... | 130 |
| Figura 70. Média geral para o PCS (kcal.kg-1) para os genótipos BRS508, BRS610 e BD7605 in natura, pré-tratado e após hidrolise enzimática..... | 133 |
| Figura 71. Média geral para PCI (kcal.kg-1) para os genótipos BRS508, BRS610 e BD7605 in natura, pré-tratado e após hidrolise enzimática..... | 133 |
| Figura 72. Média geral para o PCU (kcal.kg-1) para os genótipos BRS508, BRS610 e BD7605 in natura, pré-tratado e após hidrolise enzimática..... | 134 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 01. Diferenças entre celulose e hemiceluloses | 35 |
| Tabela 02. Principais fatores que influenciam a hidrólise enzimática da celulose e sua consequência (marcadas de 1-5) na hidrólise e na modelagem do processo.... | 54 |
| Tabela 03. Matriz do planejamento fatorial 2 ³ para avaliação da influência das variáveis: tempo, temperatura e concentração de ácido dos bagaços de sorgo. | 65 |
| Tabela 04. Composição química dos bagaços in natura de sorgo Forrageiro, Sacarino e Biomassa em comparação a resultados obtidos por outras pesquisas.... | 80 |
| Tabela 05. Rendimento mássico das biomassas dos genótipos de sorgo após os testes de pré-tratamento. | 84 |
| Tabela 6. Rendimento mássico das biomassas dos genótipos de sorgo após o Scaling de pré-tratamento. | 88 |
| Tabela 7. Composição química dos bagaços de sorgo in natura e pré-tratado para os genótipos sacarino, forrageiro e biomassa..... | 89 |
| Tabela 8. Resultado apresentado pela estirpe LJ03 quando inoculada no meio de crescimento em diferentes temperaturas. | 91 |
| Tabela 9. Resultado apresentado pela estirpe LJ03 quando inoculada no meio basal de fermentação nas diferentes fontes de carbono. | 92 |
| Tabela 10. Alinhamentos obtidos para a estirpe LJ03 comparada com a levedura <i>Pichia kudriavzevii</i> pertencente a Coleção de microrganismos CBS6520, utilizando pequena subunidade de RNA ribossomal do gene, sequencia parcial, Espaçador transcrito interno 1, 5..... | 93 |
| Tabela 11. Composição química dos bagaços de sorgo in natura, pré-tratado e resíduo de hidrolise. | 104 |
| Tabela 12. Produtividade de etanol de primeira e segunda geração. | 121 |

1. INTRODUÇÃO

A atual crise energética requer soluções urgentes, para garantir a demanda e a sustentabilidade mundial de energia.

A utilização do etanol tem-se destacado pelo crescente consumo, impulsionado pelo aumento do uso de veículos automotivos leves “*flex-fuel*”, além do incremento em mistura com a gasolina e da produção de biodiesel, no qual ele é utilizado no processo de transesterificação. Neste sentido, as perspectivas do aumento de produção devido a demanda nacional e internacional é realidade promissora (FERREIRA, 2015).

O etanol é produzido por via bioquímica, em um processo fermentativo, utilizam-se matérias-primas renováveis que contenham carboidratos passíveis de serem transformadas em álcool, como a glicose, sacarose, frutose, amido, dentre outras, denominando-se etanol de primeira geração (E1G).

Neste sentido o etanol é produzido prioritariamente a partir de grãos de milho e/ou sorgo nos Estados Unidos, que é o maior produtor mundial, seguido pelo Brasil, que utiliza predominantemente a cana-de-açúcar, responsável pela produção de 99% do etanol anidro e hidratado na safra 2016/17. Deve-se destacar que nos últimos anos outras matérias-primas como o milho (grão) e sorgo têm surgido como alternativa promissora.

Para suprir as necessidades de consumo de biocombustíveis estabelecidas para 2025, o Brasil precisará avançar na moagem de cana, na modernização e integração das produções de etanol de primeira e segunda geração nas usinas existentes (UNCTAD, 2016). Com este propósito, é de fundamental importância o desenvolvimento de estudos com culturas alternativas e complementares a cana-de-açúcar, que possam fornecer matérias-primas adequadas, ampliando o período de processamento industrial, com custos e eficiências compatíveis com o mercado (MASSON et al., 2015).

Dentre as alternativas promissoras para a produção do etanol destaca-se o sorgo, que pode atuar como uma matéria-prima complementar a cana-de-açúcar, tanto do ponto de vista agrônomo quanto industrial. O sorgo sacarino é constituído

de colmos ricos em açúcares fermentescíveis, amido (armazenados nos grãos), além do material lignocelulósico presente no bagaço (QUILHÓ, 2011).

A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, denominado etanol de segunda geração (E2G) é uma tecnologia desafiadora, pela necessidade de se dominar o conhecimento e os processos de transformação da biomassa em açúcares fermentescíveis, os quais precisam ser fermentados a custos compatíveis com o mercado (CHEN e FU, 2016).

Os materiais lignocelulósicos apresentam estrutura complexa e compacta sendo necessário submetê-los a pré-tratamentos físicos e/ou químicos antes da hidrólise. Este processo é um passo-chave na via da remoção/modificação da lignina e hemiceluloses, redução da cristalinidade da celulose e aumento da porosidade do material, tornando-o mais passível da hidrólise enzimática (LOSORDO et al., 2016).

O pré-tratamento é uma das etapas mais caras do processo de conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis. Segundo Rocha (2014), diversas pesquisas têm sido realizadas buscando o desenvolvimento do pré-tratamento mais eficiente e econômico, capaz de disponibilizar a maior quantidade de açúcares possível (pentoses e hexoses). De modo semelhante, destacam-se a seleção de microrganismos que apresentem habilidade para fermentar pentoses e/ou hexoses (KIM et al., 2013), assim como a integração de processos que buscam minimizar o número de operações unitárias e reduzir a demanda energética (ERDEI et al., 2013).

O desafio da produção economicamente viável do E2G baseia-se em determinar a melhor opção de disponibilizar a glicose a partir da hidrólise da celulose em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado, visando perfeita integração energética do processo, com aproveitamento dos resíduos, hemicelulose e lignina (RABELO, 2010).

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a potencialidade de 3 genótipos de sorgo (sacarino, forrageiro e biomassa) para produção de etanol 2G, com ênfase na caracterização do bagaço antes e após pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática, e na fermentação dos hidrolisados por duas leveduras, sendo a LJ3, fermentando as pentoses e as hexoses com *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2). Avaliou-se a composição dos bagaços dos 3 genótipos de sorgo em relação aos nutrientes, além

da análise de microscopia eletrônica para visualização das biomassas após os tratamentos realizados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O melhoramento na qualidade de vida da população demanda por uma solução para os problemas relacionados com a carência de alimentos, a escassez energética e a poluição (RABELO, 2010). Neste sentido, o aproveitamento dos materiais lignocelulósicos pode ser solução alternativa para estes problemas, contribuindo para a educação da sociedade num contexto ecológico e sustentável, assim como a manutenção destes valores. A biomassa é riqueza natural renovável, com elevada disponibilidade e relativa facilidade de uso. Entre as biomassas lignocelulósicas que podem ser empregadas para a produção de etanol, destaca-se o bagaço de sorgo, matéria-prima interessante tanto do ponto de vista agrônomo, quanto industrial.

2.1 Sorgo- Aspectos gerais da cultura

O sorgo é planta da família Poacea, do gênero *Sorghum*, e da espécie *Sorghum bicolor* (L.) Moench. É originária da África, provavelmente da região da Etiópia e do Sudão. Foi inicialmente difundida na África, depois Ásia e mais recentemente nas Américas.

É o quinto cereal mais cultivado do mundo, sendo a base alimentar de mais de 500 milhões de pessoas que vivem em mais de 30 países. Os grãos são amplamente utilizados na alimentação humana em países da África e Ásia, sendo no ocidente empregado na alimentação animal e na elaboração de xarope, álcool e açúcar (SOUZA, 2011).

De acordo com Borém, Pimentel e Parrella (2014), esta se adapta a climas tropicais e em regiões cuja precipitação é de 375 a 625 mm. Na estrutura radicular apresenta raízes que contêm sílica na endoderme, grande quantidade de pêlos absorventes e altos índices de lignificação de periciclo, conferindo a cultura maior tolerância à seca do que as demais plantas cultivadas (DINIZ, 2010). O caule do tipo colmo é dividido em nós, entrenós e folhas ao longo de toda a planta. Sua inflorescência é uma panícula e o fruto é uma cariopse ou grão seco, possuindo espécies anuais e espécies vivazes (FREITA, 2013). A planta pode atingir de 1 a 4

metros de altura, tendo vários caules por pé (perfilhamento), em que cada um dos colmos apresenta inflorescência terminal. A flor é constituída por espiga séssil, fértil, acompanhada por duas espiguetas estéreis pedunculadas, característica do gênero (DINIZ, 2010).

A planta produz vários compostos fenólicos que atuam como defesa química contra pássaros, patógenos e outros competidores, podendo interferir direta ou indiretamente sobre os microrganismos fermentadores. Entre esses compostos, destaca-se no grão, o tanino condensado, conferindo resistência ao ataque de pássaros. Esta substância é adstringente e pode dificultar a digestibilidade dos grãos (MAGALHAES et al., (2000); VON PINHO e VASCONCELOS (2002).

Outro composto presente na planta de sorgo é a durrina, um glicosídeo cianogênico que em altas concentrações pode provocar morte em animais e seres humanos. Esse fator tem prejudicado muito o cultivo e a comercialização do sorgo frente aos outros cereais (DINIZ, 2010). No aparelho digestivo dos animais por ação enzimática, pode produzir ácido cianídrico, glicose e p-hidroxibenzaldeído.

2.1.2 Fenologia do Sorgo

O sorgo é planta de metabolismo C₄, de dias curtos que proporciona altas taxas fotossintéticas e demanda temperaturas superiores a 21°C para bom crescimento e desenvolvimento (MURRAY et. al., 2008; MAGALHÃES et al., 2010).

Caracterizada por ser cultura de ciclo fenológico curto (de 90 a 120 dias) alcançando maturação fisiológica em período aproximado de 4 meses, capaz de produzir teores de açúcares próximos aos da cana-de-açúcar em menor tempo. (FONTES et al., 2011).

Pode ser cultivado onde a precipitação anual se situa entre 375 e 625 mm ou sob irrigação suplementar (RIBAS, 2008). Devido às características xerofíticas, o sorgo mantém-se dormente durante o período de seca, retomando o crescimento assim que as condições se tornam favoráveis (LANDAU e SANS, 2009). A temperatura ótima varia entre 16°C e 38°C conforme a cultivar (EMBRAPA, 2010).

Durante a fase de instalação da cultura, é importante que a germinação, emergência e crescimento inicial da plântula, ocorram em menor tempo possível

garantindo estande ideal de plantas. É fundamental também o controle eficiente das plantas daninhas até a fase de indução floral, para que a produtividade não seja reduzida significativamente (DINIZ, 2010).

Por outro lado, a Embrapa (2010) destaca que não existem dados acerca de como os estádios iniciais da cultura podem afetar o rendimento, entretanto, com um bom estande, com rápida formação da parte aérea e do sistema radicular, a planta se torna mais apta a enfrentar possíveis estresses ambientais durante o ciclo.

O estágio de desenvolvimento da planta pode ser dividido em três fases: desde a fase vegetativa até o florescimento. Através da Figura 01, pode-se observar as fases: 1-) Vegetativa – desde a germinação até a iniciação da panícula; 2-) Reprodutiva – desde o surgimento da panícula até o florescimento, exibindo vários processos de crescimento, que se afetados poderão comprometer o crescimento e desenvolvimento da área foliar, sistema radicular, acumulação de matéria seca e o estabelecimento de um número potencial de sementes; 3-) Maturação – fase que ocorre a floração e a maturação fisiológica dos grãos. Esta fase é a mais importante considerando-se o enchimento dos grãos (FERREIRA, 2015).

O rendimento da cultura pode ser comprometido se os processos fisiológicos forem afetados, dentre estes a área foliar, o desenvolvimento do sistema radicular, o acúmulo de massa seca e o estabelecimento de número potencial de sementes (DINIZ, 2010).

A resistência das plantas à seca é característica complexa, envolvendo simultaneamente características de morfologia, fisiologia e bioquímica. Existem três mecanismos básicos relacionados à seca: resistência, tolerância e escape. O sorgo apresenta os mecanismos de escape, através de um sistema radicular profundo e ramificado, que é eficiente na extração de água do solo, além de tolerância, de acordo com Diniz (2010).

Diversos insetos e patógenos podem atacar a cultura de sorgo. Dentre esses destacam-se duas espécies de pulgão (pulgão de trigo e o pulgão de milho), broca da cana-de-açúcar e as de solo (lagarta elasmó, lagarta rosca e as formigas) (SILVA, 2014). Dentre as doenças, se destacam: a podridão das sementes pode afetar a germinação e o desenvolvimento vegetativo da cultura; doenças foliares tais como a antracnose, ferrugem, vírus do mosaico da cana-de-açúcar e o mildio do

sorgo; doenças do colmo, podridão de *Macrophomina* e a podridão vermelha do colmo, e a doença açucarada do sorgo “ergot” (*Sphacelia sorghi*) (EMBRAPA, 2009).

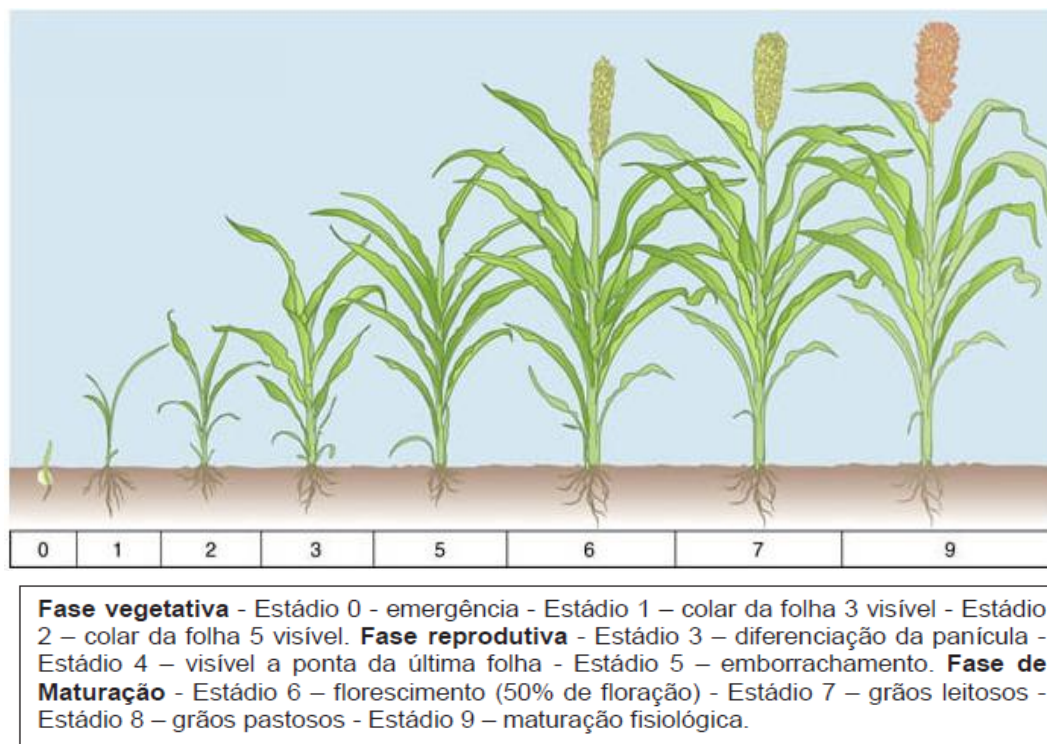


Figura 01. Fenologia da cultura do Sorgo- Estágios de crescimento da fase de emergência até a fase de maturação.

Fonte: <http://weedsoft.unl.edu/documents/GrowthStagesModule/Sorghum/Sorg.htm>

2.1.2.1 Tipos comerciais de sorgo

O sorgo pode ser classificado em cinco genótipos: granífero, forrageiro, sacarino, biomassa e vassoura. Dentre estes genótipos, o granífero é o mais expressivo economicamente.

2.1.2.2 Sorgo Granífero

O sorgo granífero (Figura 02) possui grande importância econômica no Brasil, sendo utilizado como substituto do milho em rações animais, principalmente para aves e suínos, proporcionando, redução significativa nos custos de produção em

virtude do preço do sorgo ser de 20% a 30% inferior ao do milho (COELHO et al., 2002).

O aumento na produção deste sorgo no Brasil ocorreu principalmente pelo aumento do consumo *per capita* de proteína animal (CASTRO, 2014). O grande impulso veio do aumento do consumo da carne de frango, acarretando assim crescimento no consumo de rações balanceadas, tornando o sorgo muito valorizado pelas indústrias de rações (COELHO et al., 2002).

Outra forma de utilizar os grãos de sorgo é por meio da produção de farinha, que pode substituir parcialmente a farinha de trigo na confecção de vários produtos. Essa substituição não altera significativamente a qualidade do produto, principalmente pelo mesmo apresentar cor branca, não alterando assim o sabor e a cor dos produtos finais (VON PINHO, VASCONCELOS, 2002).



Figura 02. Sorgo granífero. Fonte: <http://sorgo.net.br/sorgo-granifero/>

2.1.2.3 Sorgo Forrageiro

O sorgo forrageiro (Figura 03) é utilizado para silagem na alimentação de bovinos. Apresenta características fenotípicas que determinam facilidade de plantio, manejo, colheita e armazenamento, alto valor nutritivo, alta concentração de carboidratos solúveis que garantem adequada fermentação láctica, bem como altos

rendimentos de massa seca por unidade de área (NEUMANN et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2005).

Por essas razões, a importância do sorgo como cultura forrageira tem crescido em diversas regiões do mundo (TEIXEIRA et al., 2014). No Brasil, o sorgo forrageiro ocupa aproximadamente 40% do total da área cultivada de sorgo, principalmente devido à expansão da produção de leite e confinamento de bovinos (COELHO et al., 2002).

Dentre os híbridos forrageiros destaca-se o BRS610, pela produtividade de massa seca, excelente sanidade foliar e resistência ao acamamento. A alta digestibilidade da massa seca confere qualidade a silagem do BRS610, completando o valor agrônômico e tornando-o um dos mais atrativos híbridos de sorgo para silagem do mercado (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2005).



Figura 03. Sorgo forrageiro. Fonte: Imagem da pesquisa.

2.1.2.4 Sorgo Sacarino

Empregado como cultura energética, por apresentar potencialidades atraentes como matéria-prima, o sorgo sacarino (Figura 04) tem na constituição três grupos de materiais susceptíveis a serem fermentados em etanol – os açúcares (no

caule), o amido (nos grãos), e o material lignocelulósico (bagaço resultante após extração do açúcar) (QUILHÓ, 2011).

A produção de sorgo sacarino no Brasil vem ganhando destaque atualmente por se assemelhar a cana-de-açúcar quanto a fisiologia e características tecnológicas, ou seja, também acumula açúcar no colmo e fornece bagaço para a indústria (FREITA, 2013). Este surge como uma alternativa de matéria-prima para produção de etanol no período de entressafra da cana, período em que as destilarias permanecem paradas, sobretudo nos meses de março e abril, ou em casos de pouca oferta do produto no mercado (CORSINO, 2011).

O híbrido BRS508 (sacarino) apresenta alto teor de açúcar no caldo, que aliado ao elevado potencial de produzir colmos, torna-o muito cultivado. Os teores de açúcares fermentescíveis dessa cultivar podem atingir 18 a 22.9 °Brix, possibilitando preparo de mosto adequado ao processo fermentativo (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2012).



Figura 04. Sorgo sacarino. Fonte: Imagem da pesquisa.

2.1.2.5 Sorgo Biomassa

O sorgo biomassa (Figura 05) apresenta grande quantidade de massa verde, colmos grossos e fibroso, pequena produção de grãos e porte muito alto (EMBRAPA, 2014). Possui a particularidade de ser menos sensível ao fotoperíodo, o que possibilita a ampliação do ciclo vegetativo, ao mesmo tempo, que proporciona o aumento da produção de biomassa por hectare/ciclo, em comparação com as cultivares sensíveis ao fotoperíodo (PARRELA et al., 2010; PEREIRA et al., 2012).

O sorgo biomassa é matéria-prima energética ideal devido a versatilidade como fonte de amido e fibras. Por estas características, pode se destacar como matéria-prima energética, graças a flexibilidade de uso. Pode ser empregado em combustão direta em caldeiras, assim como para a produção de biocombustíveis através de novas tecnologias (energia verde), além da produção de químicos renováveis (CARRILLO et al., 2014).

A obtenção de variedades com maior produção de biomassa tem sido uma meta de diversos programas de melhoramento genéticos. Neste sentido, o sorgo Alta Biomassa Blade® (BD7605) surgiu como alternativa competitiva para aumentar a quantidade de matéria-prima para a bioeletricidade nas usinas.



Figura 05. Sorgo biomassa. Fonte: Imagem da pesquisa.

2.1.2.6 Sorgo Vassoura

É planta muito alta, de porte de 2 a 3 metros de altura. O sorgo vassoura (Figura 06) apresenta como característica principal panícula com um eixo central bem desenvolvido, bem como inúmeros eixos secundários, panícula aberta e ereta e pequena quantidade de grãos. Tem importância econômica regionalizada, principalmente no Sul do Brasil e no interior de São Paulo, para pequenos produtores. Sua panícula ou raquis é a parte mais importante da cultura, sendo que após ser colhida e seca é empregada na fabricação de vassouras (brancas), como produto artesanal (DIPAP, 2010).



Figura 06. Sorgo vassoura. Fonte: Mfrural.
<http://www.mfrural.com.br/detalhe/sementes-de-sorgo-vassouras-155808.aspx>.

2.2 Macro e micronutrientes nas plantas

Não somente na cultura do sorgo, considera-se que a fertilidade dos solos, a nutrição e adubação são componentes essenciais para a obtenção de maiores produtividades. Assim, o conhecimento da marcha de absorção dos nutrientes deve estar sincronizada com a disponibilização desses nutrientes em quantidade, forma e época adequada (PIVETTA, 2014).

O nitrogênio constitui um dos elementos essenciais ao desenvolvimento e crescimento das plantas pelas funções relevantes na produção e síntese de aminoácidos, proteínas, aminas, amidas, amino açúcares, purinas e pirimidinas, alcaloides, coenzimas, vitaminas e pigmentos. O nitrogênio é absorvido durante quase todo o ciclo vegetativo do sorgo, sendo que o período de maior necessidade inicia-se entre os 30-40 dias após a emergência das plantas. A deficiência de nitrogênio nas plantas de sorgo manifesta-se por apresentar plantas com reduzido desenvolvimento vegetativo e com coloração verde-pálida, inicialmente nas folhas baixas, ou seja, as mais velhas.

O fósforo é macronutriente essencial para que a planta possa atingir maiores produtividades de biomassa. Está presente nas plantas em quantidades menores do que as de nitrogênio, potássio e cálcio. Ele desempenha função importante no crescimento do sistema radicular e no perfilhamento das gramíneas (SANTOS et al., 2002).

O potássio é nutriente muito exigido pelas plantas, embora não faça parte de qualquer composto orgânico no sorgo, não apresentando, portanto, função estrutural. Assume papel importante nas plantas como ativador enzimático, de mais de 60 enzimas, tais como as sintetases e as quinases, para as quais o potássio é indispensável (VIEIRA, 2014). A maior parte do potássio absorvido pela planta do sorgo forrageiro e/ou biomassa, é exportada para parte aérea, e outra parte permanece na área como resíduo vegetal (PRADO, 2008).

O alumínio é elemento que pode ser tóxico às plantas, especialmente quando em excesso no solo. A toxidez deste elemento é fator importante que limita a produtividade do sorgo em solos ácidos. O calcário, além de eliminar o alumínio, que precipita na forma de $Al(OH)_3$, fornece cálcio e magnésio ao solo e às plantas.

O cálcio é elemento imóvel na planta, tendo como principais funções a estruturação da planta, aumentando a resistência mecânica dos tecidos e a formação da parede celular, constituindo-se no principal composto do ponto de vista quantitativo Malavolta et al. (1996) e Prado (2008). Pode atuar ainda como neutralizador de ácidos orgânicos no citosol (VIEIRA, 2014).

O magnésio tem como principal função nas plantas a participação na constituição da molécula de clorofila, da qual o magnésio é o elemento central

(PRADO, 2008). Também atua como ativador enzimático, que juntamente com o potássio apresentam-se como elementos de maior expressão para a ativação de diversas enzimas.

O cobre é elemento que atua principalmente como ativador enzimático, podendo ser constituinte de enzimas como as platicianinas e polifenoloxidades. De acordo com Prado (2008), a deficiência deste nutriente não é fácil de ser identificada. Em plantas anuais, como o sorgo, nos estádios iniciais de desenvolvimento, a deficiência severa pode levar à morte das plântulas. Esta deficiência pode contribuir para o incremento da incidência de doenças em plantas, uma vez que o Cu apresenta importante ação fungistática (VIEIRA, 2014).

O zinco é um micronutriente limitante para a maioria das culturas devido à sua baixa concentração no solo e a práticas agrícolas inadequadas, como o excesso de emprego do calcário (PRADO, 2008). Observa-se a deficiência de zinco na cultura do sorgo, principalmente com maior frequência em solos sob vegetação de cerrado. A deficiência de zinco é normalmente caracterizada pelo encurtamento dos internódios e da folha pequena, entretanto, têm-se faixas amareladas (ou brancas) entre a nervura e as bordas das folhas. Também podem levar à clorose induzida por deficiência de ferro, entretanto os sintomas nas folhas pequenas caracterizam a deficiência de zinco. (PRADO, 2008).

Ao contrário do zinco e do boro, o ferro é o micronutriente mais abundante em solos tropicais, sendo importante na biossíntese de clorofila e faz parte de classes de proteínas, e nos constituintes enzimáticos que transportam elétrons, e também na ativação de enzimas. (PRADO, 2008). Ele é essencial para síntese de proteínas e ajuda a formar alguns sistemas respiratórios enzimáticos, assim, sua deficiência caracteriza-se inicialmente pela redução no tamanho dos cloroplastos, na síntese de proteínas e no conteúdo de clorofilas (VIEIRA, 2014).

O manganês participa na planta de um composto orgânico como ativador enzimático, que desempenha funções vitais e, conseqüentemente, a produção de massa seca das plantas (VIEIRA, 2014). Ao contrário do boro e do zinco, o manganês é o segundo micronutriente mais abundante em solos tropicais, perdendo apenas para o ferro, sua deficiência é caracterizada por clorose da superfície das

folhas jovens, podendo progredir entre as nervuras, conhecida por um reticulado grosso (PRADO, 2008).

Segundo Fornasieri Filho & Fornasieri (2009) o sorgo é uma planta eficiente na utilização dos nutrientes presentes ou adicionados ao solo pela adubação, em função do seu desenvolvido sistema radicular. A adubação do sorgo granífero tem sido intensamente estudado, e em segundo lugar o do sorgo forrageiro. A adubação do sorgo sacarino e biomassa carecem de informações específicas, verifica-se que estas têm sido adaptadas através das informações obtidas para o sorgo forrageiro, considerando-se a produtividade esperada. Entretanto, os novos híbridos de sorgo sacarino e biomassa podem apresentar exigências nutricionais específicas, devido ao seu metabolismo voltado ao acúmulo de açúcares nos colmos e alta produtividade de matéria seca (PIVETTA, 2014).

Diante do exposto, é fundamental o conhecimento sobre nutrição de plantas de sorgo para se aplicar adequadamente o manejo nutricional, visando a manutenção de altas produtividades. Através desta operação evita-se o empobrecimento do solo e/ou o desbalanço de nutrientes, possibilitando obter eficiência e a qualidade do processo de produção de etanol (SANTOS et al., 2015).

2.3 Produção de Biocombustíveis de Primeira e Segunda Geração

O termo biocombustível se refere a combustíveis líquidos, sólidos ou gasosos oriundos de vários tipos de biomassa (FERREIRA, 2010). E de acordo com a origem desta biomassa, os biocombustíveis podem ser classificados como de primeira e de segunda geração (FIGUEIREDO; FARIAS FILHO, 2009).

Os biocombustíveis de primeira geração são combustíveis produzidos por tecnologias estabelecidas e comprovadas, e pelo uso de matérias-primas de culturas agrícolas (FIGUEIREDO; FARIAS FILHO, 2009). Enquanto os de segunda geração, são produzidos a partir de materiais lignocelulósicos presentes em resíduos de origem vegetal. Entretanto para a produção do segundo, as tecnologias existentes, encontram-se ainda em processo de desenvolvimento e aperfeiçoamento (PACHECCO, 2011).

O etanol, ou álcool etílico, é líquido incolor, volátil, inflamável, totalmente solúvel em água, apresenta fórmula molecular C_2H_6O , podendo ser obtida por via química e por via fermentativa (LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M, 2015). Por via química, obtém-se o etanol a partir de hidrocarbonetos não saturados, como o eteno e o etino, e de gases de petróleo e da hulha (LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M, 2015). Porém, a via fermentativa é a maneira mais importante e econômica para obtenção do etanol no Brasil devido, principalmente, ao grande número de matérias-primas naturais existentes em todo o país (LIMA et al., 2001).

Com a crise do petróleo, em 1975, foi criado o Pró-álcool (através do decreto nº 76.593), com a implantação de diversas destilarias de etanol em todo o Brasil, visando o uso alternativo deste combustível em substituição ao petróleo e seus derivados (BARCELOS, 2012). O governo brasileiro passou a investir grandes quantias no cultivo da cana-de-açúcar a fim de se obter o etanol a partir da fermentação da sacarose (LORA e ANDRADE, 2009).

Mesmo com a interrupção da trajetória virtuosa do etanol (Proálcool) no início da década de 1990, em resposta à queda nos preços relativos do petróleo e aos problemas de natureza fiscal do governo, que eliminaram os subsídios e levaram a uma perda de espaço relativo para a gasolina; um novo ímpeto foi garantido ao etanol combustível graças aos novos veículos bicombustíveis (*flex fuel*) (BASTOS, 2007; CHANDEL et al., 2014).

Nesse novo cenário, as atenções voltadas para o etanol não estão mais restritas ao etanol combustível, mas incorpora o etanol como matéria-prima para obtenção de diversos produtos químicos (alcoólquímica), tais como o eteno (derivado do petróleo), o qual é matéria-prima para resinas, além de produtos hoje importados derivados do etanol, como os acetatos e o éter etílico (SILVA, 2014).

Atualmente, com o crescimento do pensamento sustentável, a alcoólquímica vem recebendo destaque no setor industrial, fazendo com que o etanol substitua gradativamente o petróleo como fonte de matérias-primas (BASTOS, 2007; RODRIGUES, 2011).

2.4 Biomassas Lignocelulósicas

Dentre os materiais lignocelulósicos para produção de etanol destacam-se seis grupos principais: coníferas e folhosas, resíduos de celulose (papel de jornal, papel de escritório), biomassa herbácea (feno, gramíneas), resíduos municipais sólidos e resíduos de agricultura (bagaço de cana, palha de milho, palha de trigo, palha e casca de arroz, palha de cevada, bagaço de sorgo, caroços de azeitona e celulose) (BARCELOS, 2012).

Os materiais lignocelulósicos são caracterizados por serem fibrosos e capazes de formar uma estrutura vegetal complexa devido ao entrelaçamento entre os principais constituintes, como a celulose, hemiceluloses e lignina (ASSUMPÇÃO, 2015). A Figura 07 apresenta um modelo da estrutura macromolecular dos principais constituintes do material lignocelulósico.

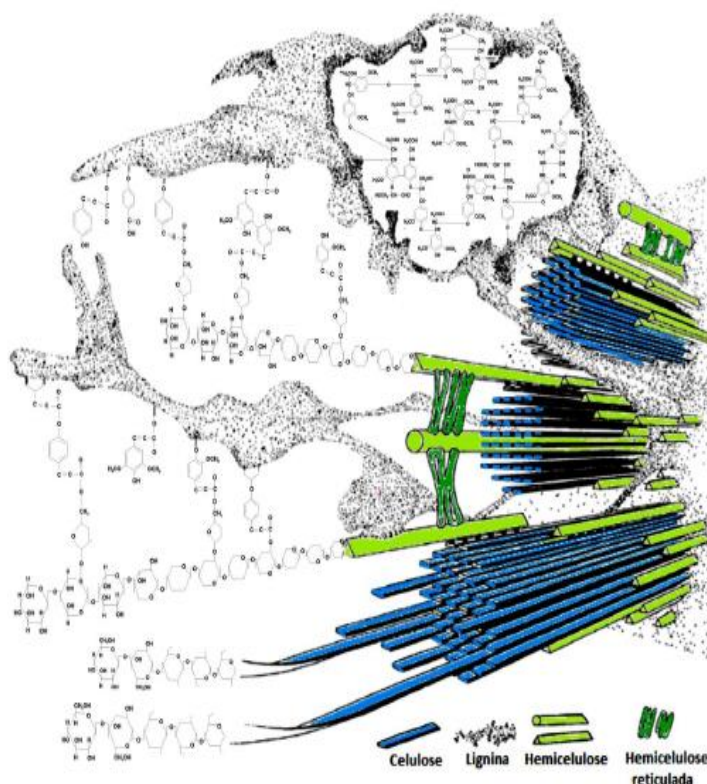


Figura 07. Modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico (parede secundária) (BIDLACK et al., 1992 apud RABELO, 2010).

Analisando a Figura 07 observa-se que os componentes são arranjados de modo que as cadeias de celulose e hemiceluloses sejam fixadas pela lignina. Paralelamente, as cadeias de celulose se mantêm compactadas através de ligações de hidrogênio que promovem a rigidez da planta, enquanto que a lignina circundante estrutura os componentes e age como uma barreira física para o ataque de microrganismos e água (RABELO, 2010). As hemiceluloses, por sua vez, proporciona a ligação entre a celulose e a lignina formando assim a rede fibrosa.

Entretanto estes materiais apresentam uma complexa estrutura morfológica dificultando a conversão deste tipo de biomassa em biocombustíveis ou outros produtos de interesse (BARCELOS, 2012).

2.4.1 Celulose

A celulose, $(C_6H_{10}O_5)_n$, é classificada como um carboidrato e destaca-se por ser o polímero natural mais abundante da terra, sendo obtido a partir de fontes renováveis, com produção anual de mais de 50 bilhões de toneladas (SILVA et al., 2009).

A celulose é formada por unidades de glicose unidas por ligação β 1-4 sendo um substrato perfeito para processos fermentativos. A rigidez e sustentabilidade estrutural das paredes celulares dos vegetais é garantida por interações entre os polissacarídeos de celulose, reforçados dentro de uma matriz de hemiceluloses e pectinas. Essa sustentação estrutural é uma importante função da celulose que só se faz possível pela sua extrema insolubilidade em água sob condições normais (BANERJEE et al., 2016; OGEDA; PETRI, 2010).

A ligação β resulta na rotação de 180° do plano das unidades alternadas da glicose, essa ligação glicosídica é do tipo 1,4 (pois envolve os carbonos 1 e 4). Duas unidades de anéis glicosídicos invertidos entre si, com um ângulo de 180° em relação a um mesmo plano, formam uma unidade de celulose denominada celobiose (Figura 08) (KLEMM et al., 2005).

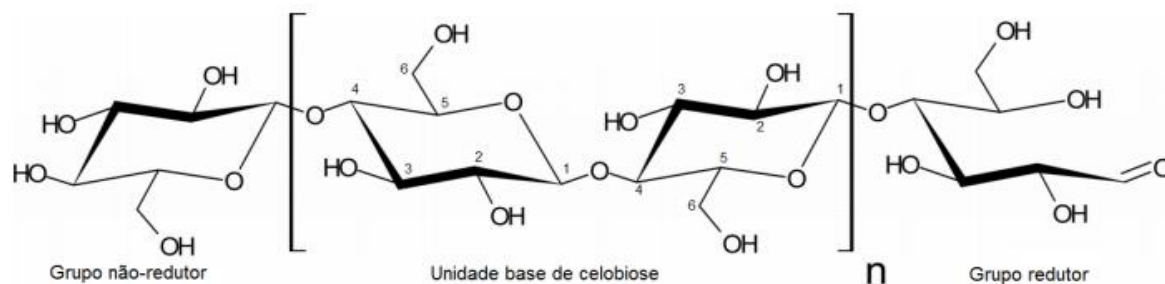


Figura 08. Estrutura molecular do polímero natural celulose e da sua unidade monomérica celobiose (KLEMM et al., 2005).

Na celulose, as cadeias de glicose são unidas por forças de Van der Waals e por ligações de hidrogênio na estrutura cristalina, sendo esta estrutura chamada de fribila elementar, que consiste em aproximadamente 40 cadeias de glicana (BIDLACK et al., 1992 apud RABELO, 2010). A junção destas fibrilas elementares, que essencialmente apresentam comprimento infinito e uma largura de aproximadamente 250 Å, dá a formação das microfibrilas (FAN et al., 1982 apud BARCELOS, 2012).

As regiões dentro das microfibrilas que apresentam elevada ordem são denominadas de regiões cristalinas e as regiões menos organizadas, denominadas amorfas (RABELO, 2010). As duas formas ocorrem em proporções características em celuloses de diferentes origens, e o ataque enzimático pode ser preferencial em um dos tipos de estrutura (GAMA, 1996). Na região cristalina a fibra tem maior grau de flexibilidade (FENGEL e WEGENER, 1989 apud BARCELOS, 2012). A cristalinidade pode ser estudada por várias técnicas, como, por exemplo, raios-x, espectroscopia no infravermelho, Raman dentre outros (BRISTOW e KOLSETH, 1986 apud RABELO, 2010).

O material amorfo é definido como o material que é disforme ou não apresenta uma forma definitiva, entretanto, a celulose amorfa, provavelmente, ainda possui algum grau de ordem (O'SULLIVAN, 1997). Larsson et al. (1997) investigaram molecularmente a celulose e relataram que a maioria das regiões

amorfas correspondia às cadeias situadas na superfície, visto que os componentes cristalinos ocupam o núcleo do microfibrila como apresentado na Figura 08.1(B).

Uma arquitetura molecular diferente da celulose cristalina e amorfa é sugerida por Mosier et al. (2005) e por Tenkanen et al. (2003). Ambos descrevem a celulose como sendo semicristalina, com regiões de elevada cristalinidade, com uma quantidade de aproximadamente 200 resíduos de glicose, separadas por regiões amorfas, como apresentado na Figura 08.1(A).

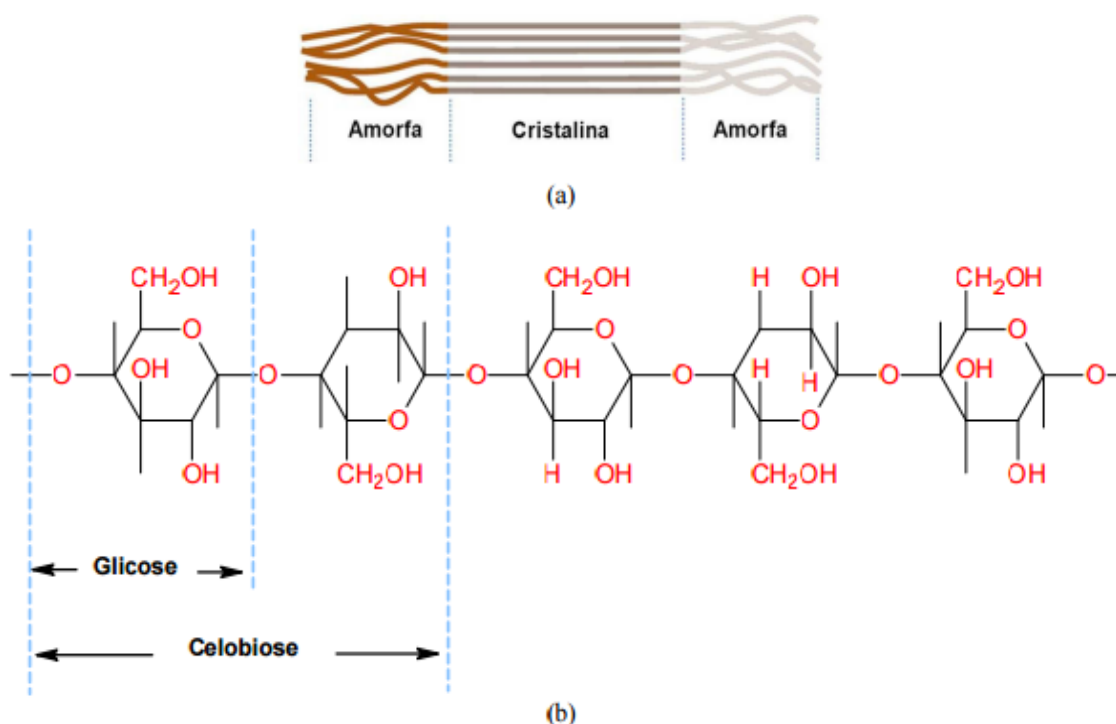


Figura 08.1: (A) Rede de microfibrilas de celulose contendo regiões cristalinas intercaladas por regiões amorfas e (B) estrutura molecular parcial da celulose tendo como unidades repetitivas o monômero de glicose e o dímero de glicose que é a unidade de celobiose (COTTON INCORPORATED, 2011).

As fibras de celulose, quando colocadas em contato com a água e certos solventes orgânicos, sofrem intumescimento. A extensão do intumescimento da celulose pode ser intercristalino ou intracristalino. No primeiro caso, o agente intumescedor penetra nas regiões amorfas da microfibrila da celulose e nos espaços entre as mesmas (RABELO, 2010). O caso mais comum de intumescimento intercristalino é o inchamento da celulose em água. No segundo caso, o agente

intumescendor penetra nas regiões cristalinas das microfibrilas. O intumescimento intracristalino pode ser efetuado pelo uso de soluções concentradas de ácidos e bases fortes e de soluções de alguns sais (D. ALMEIDA, 1988 apud RABELO, 2010).

2.4.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, mas concentram-se, principalmente, nas camadas primária e secundária, onde estão intimamente associadas a celulose e lignina (RABELO, 2010). Cerca de 30% dos polissacarídeos que constituem a parede celular dos vegetais referem-se a hemicelulose sendo este, portanto, um carboidrato abundante na natureza (DA SILVA et al., 1997; HON e SHIRAIISHI, 1991).

As hemiceluloses ou polioses são polissacarídeos de cadeia linear e ramificada. Essa molécula é amorfa e possui peso molecular relativamente baixo, junto com a celulose, lignina, pectina e proteínas que formam a parede celular das plantas (MARTINS, 2005). Estas são depositadas de maneira intercalada nas microfibrilas de celulose, em um estágio anterior a lignificação, conferindo elasticidade e flexibilidade ao agregado de microfibrila e impossibilitando que as mesmas se toquem (AGUIAR, 2010).

A cadeia principal de uma hemicelulose (Figura 09) pode consistir de uma só unidade (homopolímero), como a xilana, ou de duas ou mais unidades (heteropolímero), como a glucomanana unidas entre si por ligações de hidrogênio (MARTINS, 2005; PASTORE, 2004).

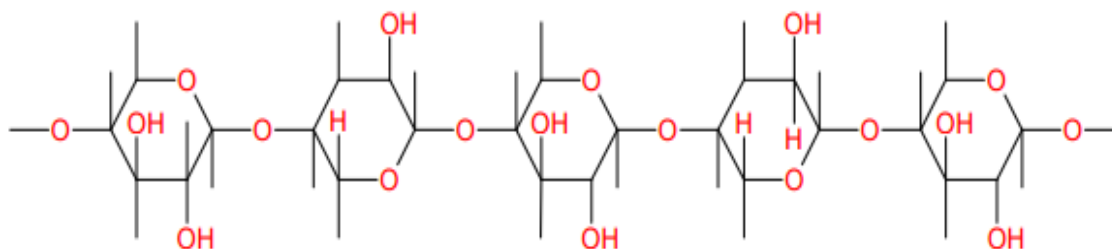


Figura 09. Estrutura molecular parcial da hemicelulose. Fonte: (FENGEL; LIN, 1984; NASCIMENTO; SILVA, 2002; PASTORE, 2004; MAREBEZI, 2009).

Os açúcares que formam as estruturas das hemiceluloses incluem pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e deoxi-hexoses. Alguns desses açúcares são mostrados na Figura 10.

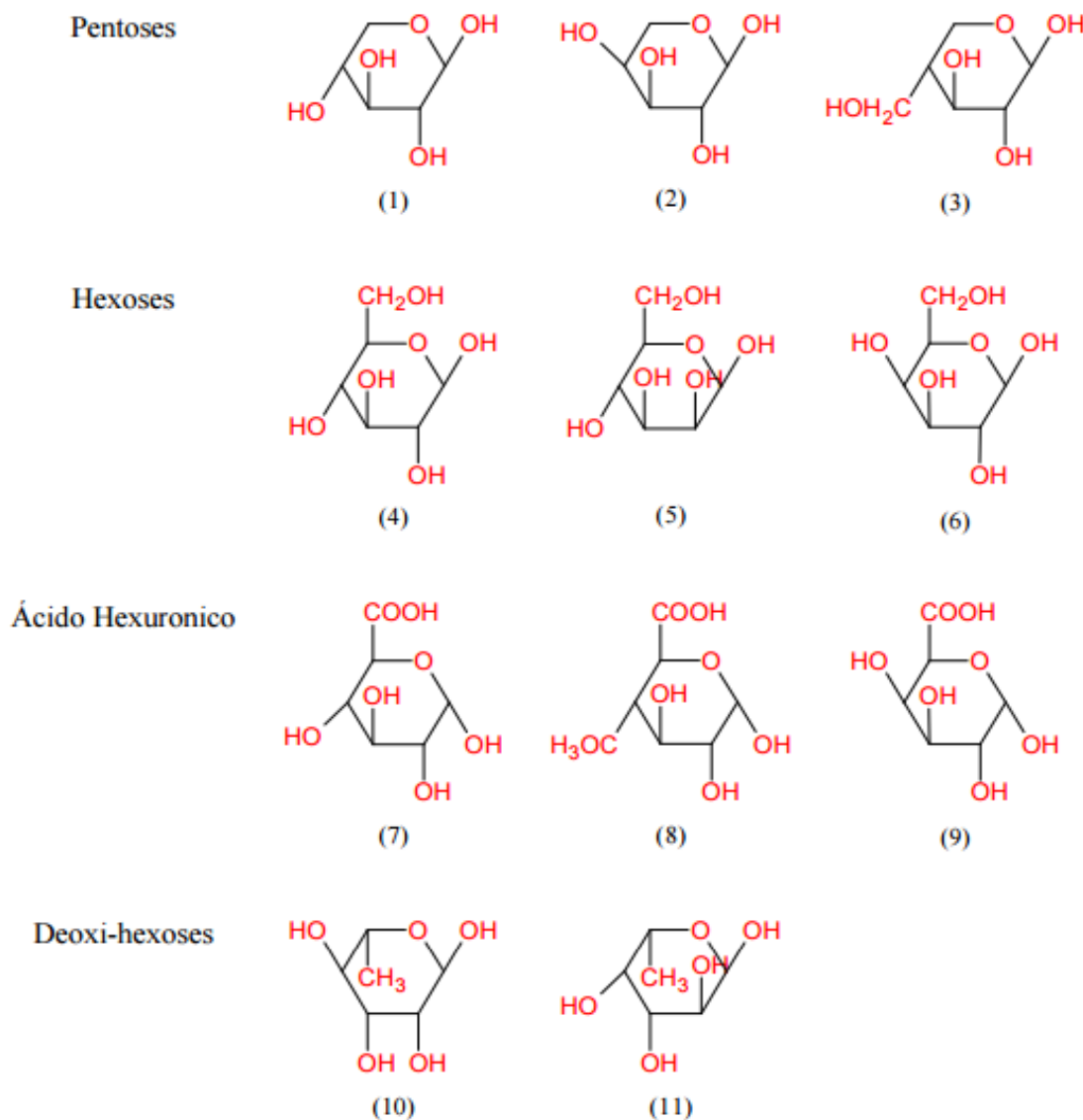


Figura 10. Representações de unidade de polissacarídeos presentes na hemicelulose: (1) β -D-Xilose, (2) α -L-Arabinopyranose, (3) α -L-Arabinofuranose, (4) β -D-Glicose, (5) β -D-Manose, (6) α -D-Galactose, (7) β -D-Ácido Glucurônico, (8) α -D-4-O-Ácido metilglucurônico, (9) α -D-Ácido galactose, (10) α -L-Ramnose e (11) α -L-Fucose (FERGEL e WEGENER (1984); NASCIMENTO; SILVA, 2002; PASTORE, 2004; MAREBEZI, 2009).

As hemiceluloses diferem da celulose, principalmente, por sua constituição em diferentes unidades de açúcares, formando cadeias moleculares curtas e bastante ramificadas. A Tabela 01 apresenta algumas diferenças entre a celulose e hemicelulose.

Tabela 01. Diferenças entre celulose e hemiceluloses (BIANCHI, 1995; RABELO, 2010).

| Celulose | Hemicelulose |
|---|--|
| Unidades de glicose ligadas entre si | Unidades variadas de açúcares |
| Grau de polimerização elevado | Grau de polimerização baixo |
| Forma arranjo fibroso | Não forma arranjo fibroso |
| Forma regiões amorfas e cristalinas | Formam somente regiões amorfas |
| É atacada lentamente por ácido mineral diluído a quente | É atacada rapidamente por ácido mineral diluído a quente |
| É insolúvel em álcali | É solúvel em álcali |

Apesar de serem ambas constituídas por açúcares, existem importantes diferenças de comportamento reacional entre as hemiceluloses e a celulose, devido, principalmente, a estrutura física. As hemiceluloses são totalmente amorfas e, portanto, menos resistentes ao ataque de agentes químicos. Embora não haja evidências de que a celulose e as hemiceluloses estejam ligadas quimicamente, as ligações de hidrogênio e a interpenetração física existente entre as mesmas tornam a separação quantitativa impossível (RABELO, 2010).

2.4.3 Lignina

Depois da celulose, a lignina é a macromolécula mais abundante existente na biosfera. É definida como substância hidrofóbica, com estrutura tridimensional e amorfa, altamente ramificada (SILVA, 2011).

A lignina apresenta na estrutura inúmeros grupos aromáticos e alifáticos, com diversos anéis fenilpropânicos substituídos ligados por meio de diferentes tipos de

ligações, como do tipo éter (hidroxilas primárias e secundárias, carbonilas, carboxilas, ésteres e ligações etilênicas) ou carbono-carbono (ARANTES, 2009; RAMIRES, 2011).

A lignina é incorporada durante o crescimento do vegetal, sendo composta basicamente de unidades fenilpropano que formam macromolécula tridimensional e amorfa. Apresenta esqueleto básico de quatro ou mais unidades de fenilpropano por molécula substituída. Segundo Rabelo (2010) esses monômeros, que formam a lignina são denominados álcoois cumarílicos, que são diferenciados entre si pelas substituições que apresentam no anel aromático:

- Álcool p-cumarílico, sem substituição, precursor das unidades p-hidroxifenílicas (H);
- Álcool coniferílico, com grupo metoxílico na posição 3 do anel aromático, precursor das unidades de guaiacil (G);
- Álcool sinapílico que dá lugar às unidades de siringilo (S) e apresenta os grupos metoxílico nas posições 3 e 5 do anel aromático.

A Figura 11 apresenta os precursores primários na formação da lignina,

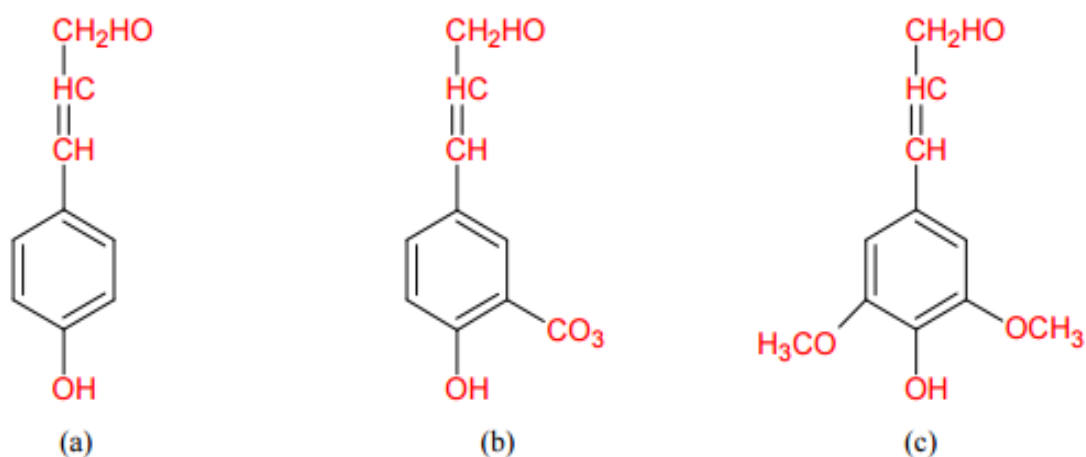


Figura 11. Precursores primários da lignina: a) álcool trans-p-cumarílico; b) álcool trans-coniferílico e c) álcool trans-sinapílico (BALOGH, 1989).

A estrutura química da lignina é bastante complexa e ainda não conhecida completamente. A proporção dos precursores da lignina varia entre as diferentes

espécies de plantas e a razão entre as mesmas tem sido usada com propósitos taxonômicos (RABELO, 2010).

As ligninas de gramíneas, tais como o bagaço de cana-de-açúcar, a formação da lignina envolve a polimerização dos três tipos de unidades monoméricas (lignina H-G-S) (RIO et al., 2005). Na Figura 12 são mostradas essas unidades da lignina.

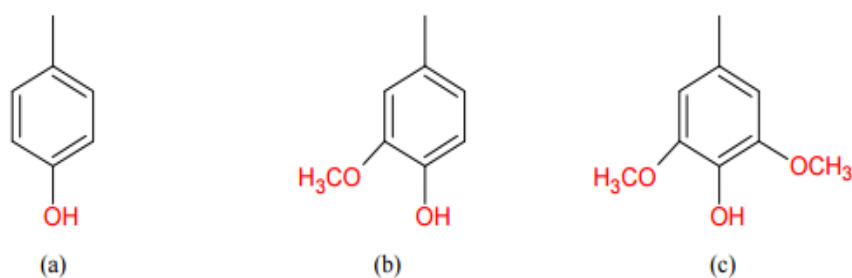


Figura 12. Principais unidades aromáticas presente na molécula de lignina: (a) p-hidroxifenila; (b) Guaiacila; (c) Siringila (SANTOS, 2001).

Durante o desenvolvimento da célula, a lignina é incorporada como o último componente na parede, envolvendo as microfibrilas celulósicas e assim fortalecendo e enrijecendo a parede celular, conferindo às plantas resistência mecânica (MARABEZI, 2009). Além disso, a lignina possui importante papel no transporte de água e nutrientes das plantas e protege os tecidos vegetais da degradação química e/ou biológica (CANILHA et al., 2010).

A estrutura química hipotética da lignina é apresentada na Figura 13.

A lignificação da parede celular é processo controlado individualmente para cada célula, sendo a lignina o último polímero a ser depositado na parede celular, surgindo inicialmente nos cantos das células após a deposição da celulose na parede secundária, que ocorre depois do término do processo de alongamento das células e quando começa o espessamento da parede secundária (RABELO, 2010). A deposição da lignina prossegue pela lamela média, pela parede primária e continua na parede secundária, até a formação da parede terciária (FENGEL e WEGENER, 1989).

A ultraestrutura da parede celular dos materiais lignocelulósicos é determinada pela interação entre a lignina, celulose e hemicelulose.

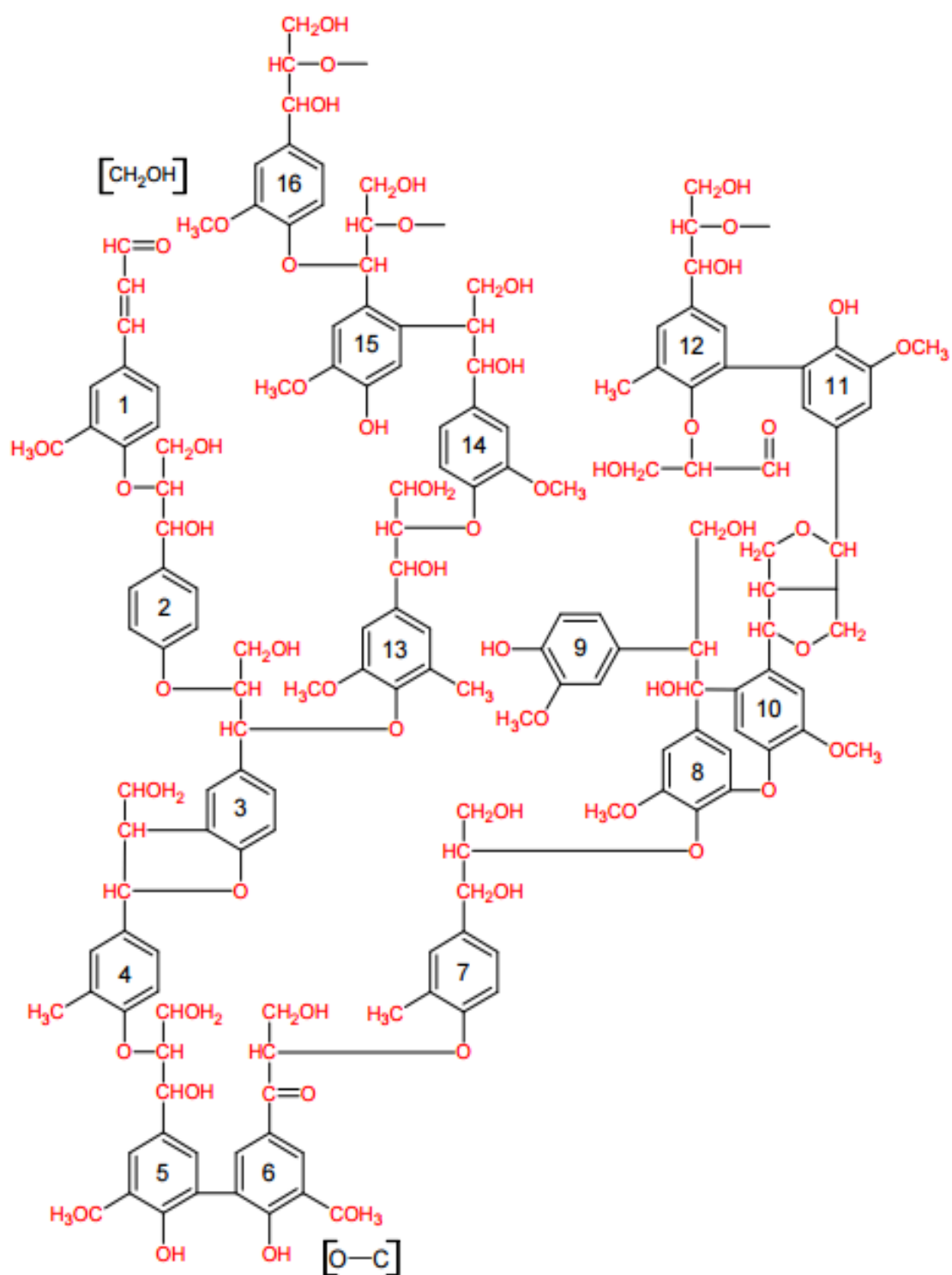


Figura 13. Estrutura parcial hipotética de lignina (FENGEL; WEGENER, 1984).

2.4.4 Pectinas

As pectinas são uma complexa família de polissacarídeos constituídos basicamente por ácido poligalacturônico e, em menor quantidade, ramnose, arabinose e galactose (BRETT e WALDRON, 1996). A pectina é formada por um esqueleto de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α (1-4), Figura 14. A cadeia de poligalacturônico esta interligada por resíduos de ramnose unidas por ligações α (1-2). Estes resíduos de ramnose podem ter unido a si largas cadeias laterais de L-arabinose e D-galactose. Em algumas pectninas, as cadeias laterais podem finalizar no ácido ferúlico unidos na posição O-3 da arabinose ou na O-2 da galactose (ANDERSEN, 2007).

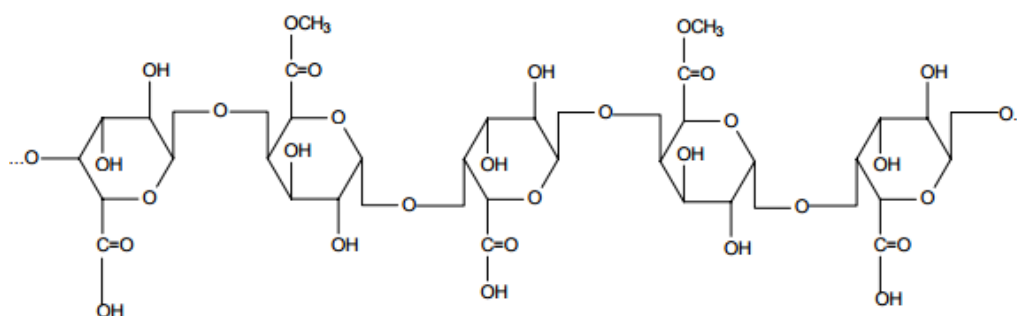


Figura 14. Estrutura geral da pectina (BOBBIO, 1989).

As pectinas constituem o componente principal da lamela média da parede vegetal. São as frações mais facilmente extraíveis da parede celular, apresentando propriedades de gel. Além disso, o ácido galacturônico é molécula carregada negativamente, o que confere a parede celular a propriedade de trocadora de íons como o cálcio (RABELO, 2010).

2.4.5 Outros Compostos

Os materiais lignocelulósicos podem conter também extensa variedade de extrativos orgânicos, os quais podem ser extraídos por solventes polares ou apolares (BARCELOS, 2012). São exemplos de extrativos: ácidos graxos, ceras,

alcalóides, proteínas, fenólicos, açúcares simples, pectinas, mucilagens, gomas, resinas, terpenos, amido, glicosídeos, saponinas e óleos essenciais.

Os extrativos são compostos intermediários do metabolismo do vegetal; proporcionam reserva energética e proteção ao vegetal contra o ataque de microrganismos e insetos, porém, têm efeito inibitório nos processos de conversão de biomassa (FENGEL e WEGENER, 1989).

A biomassa vegetal também contém uma pequena quantidade de espécies inorgânicas, tais como, potássio, sódio, cálcio, etc., como resultado dos nutrientes adquiridos durante o crescimento vegetal (YU et al., 2008; BARCELOS, 2012).

2.5 Produção de Etanol a Partir de Materiais Lignocelulósicos

A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos consta fundamentalmente de quatro etapas, com distintas possibilidades de combinação (SUN e CHENG, 2002): produção de enzimas, pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação.

As características particulares do polímero de celulose levam à formação da fibra vegetal. As fibras vegetais que constituem a biomassa estão organizadas em camadas primária e secundária que são majoritariamente constituídas de hemiceluloses, lignina e celulose (SANTOS, 2013). A camada secundária é subdividida em camadas S1, S2 e S3 (Figura 15). A camada S2 é a mais espessa, responsável pela resistência mecânica da fibra, pois é basicamente constituída de celulose (~90%) na forma de micro/macrofibrilas.

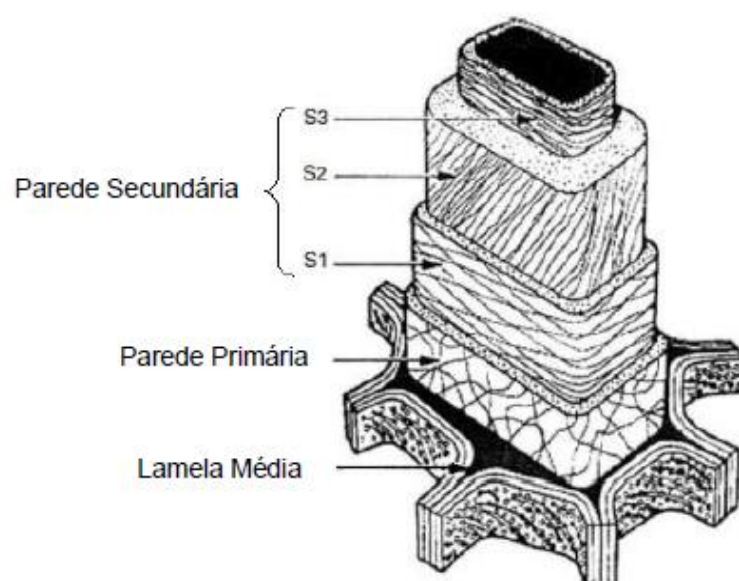


Figura 15. Estrutura hierárquica de um tecido vegetal (BARNETT e BONHAM, 2004).

Na natureza, a celulose não ocorre como uma molécula isolada individual, e sim principalmente na forma de fibras. Isso ocorre porque a biossíntese é instrumentada por complexos específicos terminais (CTs) ligados à membrana plasmática (SANTOS, 2013). Para árvores e plantas os CTs são organizados em rosetas de seis membros com cada subunidade polimerizando seis cadeias de celulose e o complexo todo 36 cadeias (Figura 16A). Essas cadeias são dispostas lado a lado e serão posteriormente organizadas em estruturas manométricas chamadas de fibrilas elementares (16B). As fibrilas elementares têm cerca de 3-4 nm de diâmetro e se combinam para formar estruturas mais espessas, as microfibrilas que contém regiões amorfas e cristalinas (Figura 16C e 16D) (MOON et al., 2001; ELAZZOUI-HAFRAOUI et al. 2008; DE MESQUITA, 2012). Segundo o modelo estrutural proposto por Battista e Smith (1962), cada microfibrila de celulose pode ser considerada como uma corrente que contém uma sequência de unidades de celulose (cristalitos), ligadas por domínios amorfos ou defeitos estruturais (Figura 16D) (SANTOS, 2013).

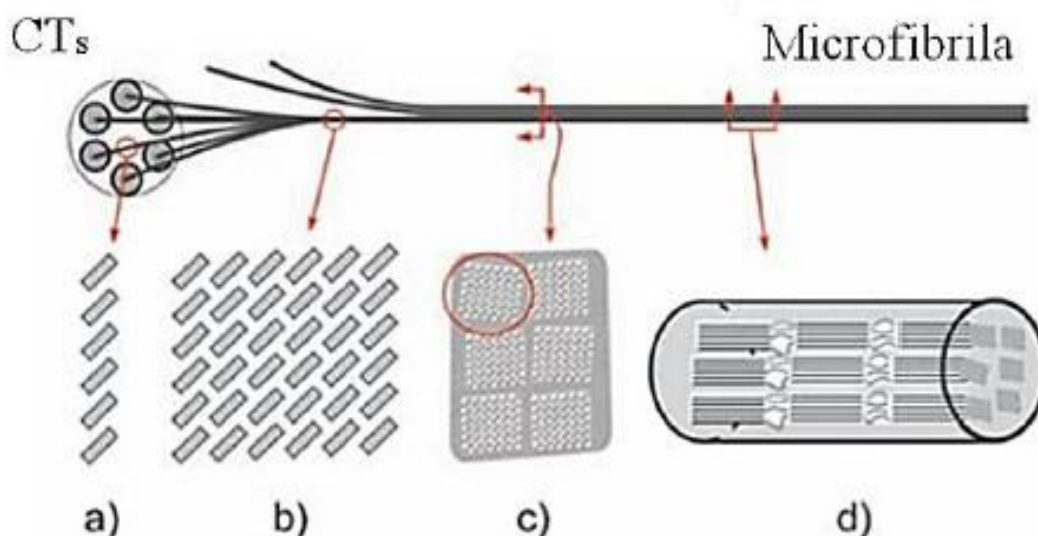


Figura 16. Representação esquemática dos níveis que precedem a formação de uma microfibrila presentes em plantas superiores. (a) seção transversal da estrutura formada pelas 6 cadeias de celulose na subunidade dos complexos específicos terminais. Cada retângulo cinza representa uma cadeia de celulose. (b) seção transversal das fibras elementares; (c) seção transversal das microfibrilas de celulose composta de 6 fibrilas elementares; (d) seção lateral das microfibrilas mostrando a configuração em série de regiões cristalinas e amorfas. (MOON et al., 2011).

As cadeias de celulose presentes em uma microfibrila são estabilizadas tanto por forças de Van der Waals quanto por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares o que possibilita a formação das microfibrilas (estruturas maiores formadas por microfibrilas), como mostrado na Figura 17 (SANTOS, 2013). Deste modo, as microfibrilas que compõem as fibras, resultantes do arranjo das moléculas de celulose, são constituídas de regiões cristalinas, altamente ordenadas, e amorfas, desordenadas. As regiões cristalinas resultam da ação combinada da biopolimerização e cristalização de celulose comandada por processos enzimáticos (SANTOS, 2013). As regiões amorfas são resultados de dois processos: imperfeições de empacotamento das cadeias de celulose localizadas na superfície da nanoestrutura, e o segundo, de maior importância, resultam do término do encadeamento das cadeias de celulose ao longo da direção longitudinal das fibrilas,

o que gera regiões amorfas intercaladas com as regiões altamente cristalinas (FENGEL e WEGENER, 1989; OKSMAN e SAIN, 2005; EICHHORN et al., 2010). Essas são denominadas, por alguns autores, de regiões em que a cristalização ocorreu com defeito (MOON et al., 2011; DE MESQUITA, 2012).

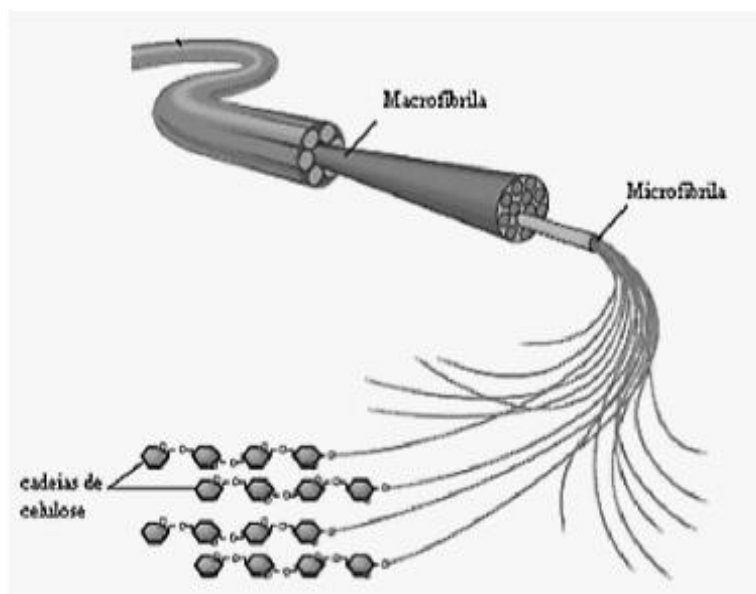


Figura 17. Estrutura hierárquica da constituição de uma macrofibrila (DE MESQUITA, 2012).

2.5.1 Produção de Enzimas

As enzimas são substâncias orgânicas, compostas por polímeros de aminoácidos, efetuando processos metabólicos na célula viva. Estas atuam acelerando a velocidade das reações químicas que ocorrem dentro de células vivas, sem sofrer qualquer alteração geral dos agentes envolvidos (ROSAS, 2003).

As enzimas são biocatalisadores de estrutura protéica globular terciária ou quaternária, termolábeis e não dialisáveis, agindo no aumento da velocidade da reação química e reduzindo a barreira energética destas reações (HARGER, 1982 apud SILVA, 2014).

São classificadas de acordo com os substratos com que reagem e pela sua especificidade de reação (LAIDLER, 1954, apud SILVA, 2014), podendo ser obtidas através de três fontes diferentes: de origem fúngica ou bacteriana, animais

superiores (enzimas pancreáticas, pepsina, catalase, renina) por microrganismos (por exemplo, as amilases, proteases, pectinases, invertases, glicose-oxidases, celulases, fitases e glicose-isomerases) ou vegetais superiores (papaína do mamão, bromelina do abacaxi e ficina do figo) (HARGER, 1982 apud SILVA, 2014). As microbianas podem ser intracelulares (enzimas retidas no interior das células microbianas) ou extracelulares (enzimas eliminadas ao meio). Em geral, as mais utilizadas nas indústrias são as enzimas extracelulares de origem microbiana.

As enzimas extracelulares que degradam o amido têm como principal aplicação à conversão do amido em monossacarídeos como a glicose, em dissacarídeos como a maltose e em oligossacarídeos como as dextrinas (SILVA, 2014), sendo utilizadas na obtenção de açúcares fermentescíveis empregadas nas indústrias cervejeiras e produção de bebidas alcoólicas.

A obtenção de enzimas a partir de microrganismos celulolíticos representa, em termos econômicos, por volta de 50% do custo global do processo de obtenção dos açúcares mediante hidrólise enzimática (WYMAN, 2001). Apesar da diminuição dos custos das enzimas nos últimos 20 anos, elas ainda representam um importante papel sobre o preço final do etanol (RABELO, 2010).

2.5.2 Pré-tratamento

O processo de produção de etanol a partir do bagaço demanda a transformação da celulose e hemiceluloses em monômeros de glicose e xilose, respectivamente, além da subsequente conversão dos mesmos, por microrganismos, em etanol. No entanto, a celulose nativa encontra-se muito protegida pela matriz lignina-carboidrato, de modo que a celulose se torna recalcitrante a ação hidrolítica, resultando em processos lentos de conversão (RABELO, 2010). Desta forma, é necessário realizar pré-tratamento do bagaço de modo a aumentar a exposição das fibras de celulose, tornando-a mais acessível aos agentes hidrolíticos enzimáticos ou ácidos.

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica consiste em uma das etapas operacionais mais relevantes em termos de custo direto, além de influenciar

consideravelmente os custos das etapas anteriores e subsequentes do processo (RABELO, 2010).

Basicamente, o pré-tratamento visa remover a lignina e a hemicelulose da biomassa (Figura 18), reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material para melhorar o acesso das enzimas à celulose e assim aumentar a conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis (MOSIER et al., 2005). Além disso, o pré-tratamento deve garantir a formação de açúcares diretamente ou na seguinte etapa de hidrólise; evitar a perda e/ou degradação dos açúcares formados; limitar a formação de co-produtos inibidores; reduzir a demanda de energia e minimizar os custos (SUN e CHENG, 2002; AGBOR et al., 2011).

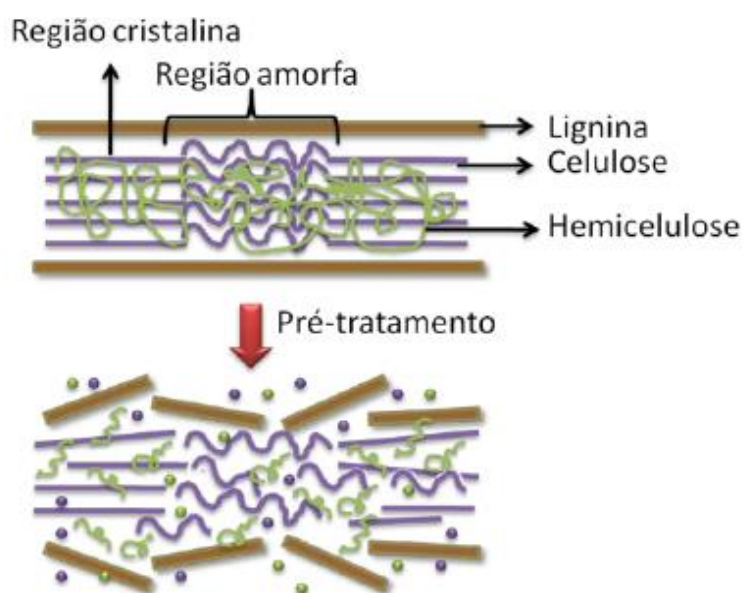


Figura 18. Pré-tratamento em materiais lignocelulósicos (Adaptado de MOSIER et al., 2005)

Os principais objetivos do pré-tratamento são: reduzir o grau de cristalinidade da celulose, dissociar o complexo lignina-celulose, aumentar a área superficial da biomassa, preservar as pentoses maximizando os rendimentos em açúcares e evitar ou minimizar a formação de compostos inibidores do processo tanto na etapa de hidrólise quando na etapa de fermentação (HSU, 1996 apud RABELO, 2010).

2.5.2.1 Tipos de Pré-tratamento

Existem diversos pré-tratamentos com diferentes efeitos e rendimentos e a escolha do mais adequado depende da biomassa empregada. Estes podem ser classificados em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos, além da combinação entre eles (MOOD et al., 2013).

Cada pré-tratamento altera de forma diferente a estrutura da biomassa. Os pré-tratamentos físicos, como a moagem e a extrusão não alteram a composição da biomassa, mas alteram a sua estrutura por meio do aumento da área superficial e redução da cristalinidade. Já os pré-tratamentos alcalinos, oxidativos, biológicos podem remover principalmente a fração da lignina, logo a biomassa será composta majoritariamente por hemicelulose e celulose ao final do processo. Os pré-tratamentos ácidos, explosão a vapor e hidrotérmico removem as hemiceluloses para a corrente líquida e forma uma corrente sólida rica em celulose e lignina, também chamada de celulignina (MORO, 2015). Como se pode ver, o pré-tratamento escolhido define a composição da biomassa que será levada para a etapa posterior, a hidrólise enzimática (SILVA et al., 2013).

A eficiência do pré-tratamento é avaliada tanto na composição físico-química da biomassa quando no seu desempenho durante a etapa de hidrólise enzimática. Em geral, um bom pré-tratamento proporciona altos rendimentos e conversões de hidrólise, não gera inibidores da fermentação, tem baixo custo, não apresenta perda de carboidratos ou degradação da biomassa, possibilita a recuperação da lignina e consome pouca energia (BALAT et al., 2008; SILVA et al. 2013).

2.5.2.2 Pré-tratamento com ácido diluído

O pré-tratamento ácido também é conhecido por pré-hidrólise, promovendo a hidrólise das hemiceluloses e outros polissacarídeos e monossacarídeos, como xilose, manose, galactose, glicose, entre outros.

Como as hemiceluloses são constituídas principalmente de xilana, o principal produto do pré-tratamento ácido é a xilose (CHEN et al., 2011). A remoção da fração hemicelulósica torna a celulose mais acessível às enzimas da hidrólise (BALAT et

al., 2008, BEHERA et al., 2014) o que, geralmente, resulta em bons rendimentos de hidrólise para este pré-tratamento (SINGHA et al., 2015). Pré-tratamentos com ácido sulfúrico têm sido um dos mais utilizados devido a sua alta eficiência (CARDONA et al., 2010), mas também os ácidos nítrico, clorídrico, fosfórico (BEHERA et al., 2014), peracético e oxálico são opções comumente reportadas na literatura (SINGHA et al., 2015). O pré-tratamento ácido pode ser conduzido em duas condições diferentes. A primeira que utiliza ácido concentrado não é tão atrativa quanto a segunda que utiliza ácido diluído, pois apresenta diversos problemas como formação de inibidores, toxicidade, corrosão e necessidade de equipamentos resistentes (SINGHA et al., 2015). O tratamento com ácido diluído, em geral, com concentração de ácido entre 0,1 e 2% (m.v⁻¹), costuma ser mais efetivo pois apresenta menor degradação de açúcares, e com isso, menor formação de inibidores (BEHERA et al., 2014).

De forma geral, o pré-tratamento ácido acarreta alguns problemas, como formação de inibidores, corrosão dos equipamentos, alto custo de operação e manutenção (BEHERA et al., 2014). Além destas desvantagens, este tratamento requer uma etapa adicional para neutralizar a biomassa ao final do pré-tratamento e eliminar os inibidores formados. Essa etapa acrescenta custos ao processo e gera uma corrente de efluente líquida (SILVA et al., 2013).

2.5.2.3 Formação de inibidores

Os compostos inibitórios podem ser classificados em dois grupos: inibidores originalmente presentes na biomassa e inibidores produzidos por condições severas na etapa do pré-tratamento.

Os inibidores presentes na biomassa lignocelulósica são facilmente liberados durante a etapa de pré-tratamento. Em contrapartida, os pré-tratamentos que trabalham em condições drásticas, ou seja, presença de reagentes ácidos combinados com altas temperaturas são fortemente passíveis a formação de produtos inibitórios devido a degradação dos açúcares e da lignina, levando assim a produção de ácidos orgânicos, aldeídos furânicos e compostos fenólicos (RABELO,

2010). Na Figura 19 notamos a procedência de cada um dos inibidores proveniente de diferentes constituintes da biomassa.

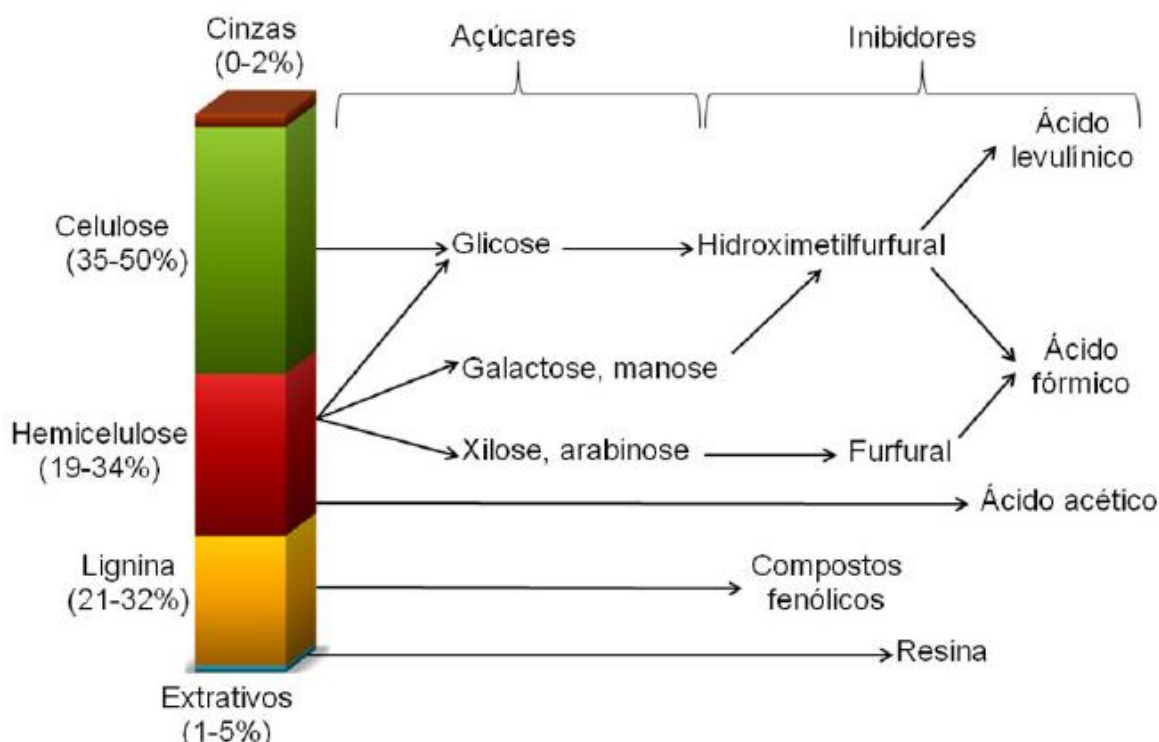


Figura 19. Formação dos componentes inibitórios (Adaptado de PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000 apud RABELO, 2010).

O inibidor produzido da degradação das pentoses resulta o furfural e das hexoses o 5-hidroximetilfurfural (HMF), os quais são bastante problemáticos para a etapa da fermentação (MUSSATO e ROBERTO, 2004). Quando é promovida a degradação destes inibidores, o ácido fórmico e levulínico são formados. Compostos fenólicos como o ácido 4-hidroxibenzoico, vanilina, catecol e siringaldeído podem ser formados pela decomposição química parcial da lignina (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000). Uma variedade de métodos biológicos, físicos e químicos pode ser aplicada com o intuito de reduzir a concentração de inibidores antes de realizar a etapa de hidrólise enzimática e fermentação.

2.5.3 Hidrólise Enzimática

Uma vez pré-tratado, a biomassa segue para a etapa de hidrólise em que suas cadeias são quebradas em açúcares fermentescíveis. As hemiceluloses presentes no material são convertidas em pentoses, predominantemente xiloses, e a celulose é convertida em glicose (CHEN et al., 2011). A reação utiliza o auxílio de um catalisador ácido ou enzimático.

As condições do processo: temperatura, pH, tempo de sacarificação, concentração enzimática e relação sólido-líquido, dependem do substrato escolhido e das características do complexo enzimático utilizado, que devem ser determinadas e otimizadas experimentalmente para cada caso (RABELO, 2010).

Diversas características da biomassa são consideradas importantes para efetuar a hidrólise enzimática: quantidade de lignina, presença de grupos acetil, cristalinidade da celulose, grau de polimerização, volume da área superficial/poros da fibra de celulose, e tamanho de partícula (SEWALT et al., 1997). Dentre a importância destas características, a eficácia de um pré-tratamento é relatada, comumente, em termos de rendimento glicosídico e não em termos da composição química e das características físicas da biomassa após o pré-tratamento.

Diversos sistemas existem para serem utilizados para realização dos processos enzimáticos, como: contínuos ou descontínuos, que apresentam o inconveniente de causar inibição da enzima pelo produto final (glicose e celobiose) (PADUKONE, 1996); com enzimas imobilizadas, que não apresenta como um sistema mais adequado já que não favorece a interação da enzima com o substrato uma vez que o resíduo após o pré-tratamento é insolúvel (MELANDER et al., 2005); com enzimas recicladas, fermentação simultânea, biorreatores de membrana (BELAFI-BAKO et al., 2006), dentre outros. As dificuldades de realizar estes processos industrialmente correspondem não só a características técnicas, mas também por fatores econômicos e ambientais.

2.5.3.1 As enzimas Celulases

A estrutura recalcitrante da biomassa dificulta a hidrólise enzimática, no entanto, a remoção da lignina e das hemiceluloses por meio de um pré-tratamento pode melhorar a eficácia deste processo. Após o pré-tratamento, a hidrólise enzimática é realizada utilizando um complexo com enzimas celulases e hemicelulases que têm a função de hidrolizar a celulose e hemiceluloses, respectivamente. Estes complexos apresentam alto custo, sendo foco de estudo e desenvolvimento de muitos grupos para que possa realmente viabilizar a rota de E2G (SHARMA; SHARMA; KUILA, 2016; ZHOU et al., 2016).

As celulases são classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico. Esses biocatalisadores atuam sobre diferentes materiais celulósicos liberando açúcares, principalmente na forma de glicose, produto de maior interesse industrial, para posteriormente serem convertidas em etanol (SHARMA; SHARMA; KUILA, 2016).

A hidrólise enzimática completa da celulose ocorre pela ação sinérgica de três tipos principais enzimas: as endoglucanases (endo-1,4-D-glucanohidrolase, ou EC 3.2.1.4), as exoglucanases (celobiohidrolases e exoglicohidrolases (1,4- β -D-glucano celobiohidrolase ou EC 3.2.1.91.)) e as celobiasas ou β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (FALKOSKI et al., 2012; VISSER et al., 2013), Figura 20.

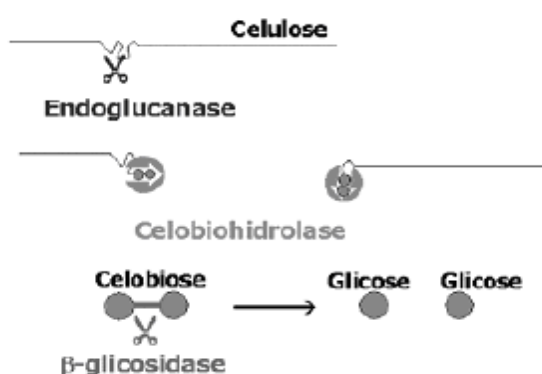


Figura 20. Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose. Fonte: Ogeda e Petri (2010).

A endoglucanase (1,4- β -D-glucana-4-glicanohidrolase) é uma enzima celulolítica que tem a função de iniciar a hidrólise, solubilizando rapidamente a celulose. Está atua na clivagem das ligações internas da fibra, atacando aleatoriamente cadeias de celulose. Enquanto hidrolisa randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, libera diferentes polímeros de oligossacarídeos e também novos terminais, sendo um redutor (hidroxila heterosídica livre na extremidade da glicose) e um não redutor (hidroxila heterosídica ligada à outra extremidade com a glicose adjacente) (BHALLA et al., 2013; CASTRO; PEREIRA, 2010).

O grupo das exoglucanases ou celobiohidrolases (CHB) tem a capacidade de hidrolisar o polímero, a partir das suas extremidades. Elas estão entre as enzimas mais eficientes como agentes celulíticos e possuem como nome sistemático 1,4- β -D-glicana celobiohidrolase. Estas enzimas desempenham papel essencial nos processos de decomposição, podendo ser dividida em dois tipos: celobiohidrolase do tipo I (EC 3.2.1.176), CBH I, que tem a função de hidrolisar terminais redutores, enquanto que a do tipo II (EC 3.2.1.4), CBH II hidrolisa terminais não redutores. O produto da hidrólise dessas enzimas é a celobiose (dímero de glicose) (BOMMARIUS et al., 2008; DEN HAAN et al., 2007; SORENSEN et al., 2015).

No grupo de exoglicosidases também estão incluídas as exoglicohidrolases (EC 3.2.1.74) que possuem como nome sistemático 1,4- β -D-glicana glicobiohidrolase (GH). Apesar de ser pouco reportada, a hidrólise promovida pela GH na degradação da fibra celulósica é de extrema importância, pois libera glicose diretamente do polímero. Assim como as celobiohidrolases, as exoglocoidrolases sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose ou glicose) (BHALLA et al., 2013; BOMMARIUS et al., 2008).

A CBH além de catalisar a hidrólise primária dos terminais não-redutores da fibra celulósica e oligossacarídeos produzindo celobiose, também tem a capacidade de atacar os terminais redutores. Durante a atuação, a CBH provoca um fenômeno ainda não elucidado completamente conhecido como amorfogênese que envolve a ruptura física do substrato, aumentando assim as regiões intersticiais. Dessa forma ocorre aumento nas taxas de hidrólise da celulose, deixando o polímero mais exposto às celulases (CASTRO; PEREIRA, 2010).

As β -glicosidases (BG) (EC 3.2.1.21) são produzidas a partir de microrganismos, plantas e animais, e têm sido propostas em vários estudos recentes para a degradação de β -glucanos a fim de produzir glicose. Esse último grande grupo de enzimas do complexo celulítico tem a função de hidrolisar a celobiose e os oligossacarídeos convertendo-os em glicose. Assim como a CBH sofre inibição pela celobiose, a BG também é inibida pelo seu produto de hidrólise (NAKAJIMA et al., 2012).

As enzimas hemicelulases hidrolisam a hemicelulose, segunda maior fração da biomassa lignocelulósica. Os tipos de hemicelulases, tais como as xilanases (E.C. 3.2.1.8), mananases (E.C. 3.2.1.78), β -xilosidases (E.C. 3.2.1.37), β -mannosidases (E.C. 3.2.1.25), α -arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55), α -galactosidases (E.C. 3.2.1.22), acetil xilano esterase (E.C. 3.2.1.72), feruloil esterases (E.C. 3.1.1.73), p-cumaril-esterases (E.C. 3.2.1.73), e α -glicuronidase (E.C. 3.2.1.139) atuam no processo de despolimerização da hemicelulose. Estas enzimas têm a função de aumentar a acessibilidade à celulose e estimular a ação de celulasas pela hidrólise e remoção dos fragmentos hemiceluloses que revestem as fibras de celulose (FALKOSKI et al., 2012).

As hemicelulases são produzidas a partir de microrganismos e plantas. Esses microrganismos têm a capacidade de produzir vários tipos padrões de hemicelulases eficientes no processo de degradação da lignocelulose. Comercialmente, são obtidas principalmente por fungos geneticamente modificados como *Trichoderma* ou *Aspergillus* (OGEDA; PETRI, 2010).

Diversos estudos têm sido realizados na sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos empregando xilanases (1,4- β -D-xilanase, EC 3.2.1.8) como suplemento as celulasas, com o objetivo de aumentar a taxa de hidrólise da fração hemicelulósica ainda remanescente da etapa de pré-tratamento. Com isso, deixam a fração celulósica mais acessível à ação das celulasas, a fim de proporcionar aumento na conversão da celulose em glicose (OHGREN et al., 2007; PETERSEN; LARSEN; THOMSEN, 2009). As xilanases podem ser produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei*, a partir do crescimento em substratos lignocelulósicos ricos em pentoses, tais como a palha de trigo, tendo como função degradar a cadeia principal de xilana constituinte da estrutura hemicelulósica (TABKA et al., 2006).

2.5.3.2 Principais fatores que afetam a hidrólise enzimática

Um dos principais obstáculos da hidrólise enzimática da celulose é a dificuldade do acesso das enzimas hidrolíticas as moléculas de celulose (JEOH et al., 2007; MOONEY et al., 1998). A presença da lignina na parede celular, além de dificultar esse acesso, ainda limita a capacidade de inchamento das fibras de celulose, diminuindo ainda mais a área superficial acessível das cadeias de celulose (ERIKSSON et al., 1991; NAKATANI et al., 2008).

O mecanismo de reação enzimática é extremamente influenciado pelas características estruturais do substrato, da natureza das celulasas e das condições do meio reacional (MAEDA et al., 2011). Desta forma, muitos pesquisadores têm indicado que os fatores que afetam a hidrólise enzimática da biomassa podem ser divididos em dois grupos: aqueles relacionados com as características estruturais do substrato e aqueles relacionados com o mecanismo do complexo enzimático (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999).

Destacando-se que, muitos fatores estão correlacionados, de forma que se torna difícil quantificar a influência de cada um isoladamente. A eficiência de hidrólise de materiais lignocelulósicos está intimamente ligada com a interação entre substrato e enzima (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999; YANG et al., 2011). A Tabela 02 apresenta os principais fatores que influenciam a hidrólise enzimática da celulose e sua consequência (marcadas de 1-5) na hidrólise e na modelagem do processo.

Tabela 02. Principais fatores que influenciam a hidrólise enzimática da celulose e sua consequência (marcadas de 1-5) na hidrólise e na modelagem do processo (ANDERSEN, 2007 apud RABELO, 2010).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|---|---|---|---|---|
| Fatores relacionado ao substrato | | | | | |
| Cristalinidade da celulose | x | | | x | |
| Grau de polimerização (DP) | | x | | | |
| Disponibilidade/acessibilidade da área superficial | x | x | x | x | x |
| Organização estrutural (macro ou microestrutura) | | | x | x | |
| Tamanho de partícula | | | x | x | |
| Porosidade | | | x | x | x |
| Presença de lignina e hemicelulose | x | | | x | x |
| Fatores relacionados à enzima | | | | | |
| Natureza do sistema enzimático empregado (EG, CBH, BG) | x | x | x | x | x |
| Tamanho relativo das enzimas | | | | x | |
| Concentração da enzima | x | x | x | x | |
| Adsorção | x | x | x | x | x |
| Sinergismo | x | x | | x | |
| Inibição do produto final | | | | x | x |
| Desativação mecânica | | | | | x |
| Inativação térmica | | | | | x |
| Irreversibilidade da ligação com a lignina | | | | x | x |

1: Aumento aparente da cristalinidade do substrato durante toda a hidrólise;

2: Diminuição do DP;

3: Mudanças contínuas na acessibilidade de superfície, e topologia da superfície (corrosão de superfície);

4: Mudanças contínuas na digestibilidade do substrato;

5: Diminuição da concentração de enzima ativa;

EG: Endoglicanase; CBH: Celobiohidrolase; BG: β -glicosidase

2.6 Processos de fermentação dos materiais lignocelulósicos

A conversão da biomassa em etanol envolve a despolimerização da celulose e hemiceluloses em seus monômeros constituintes e a posterior fermentação desses açúcares, pode ser realizada simultaneamente em um só estágio ou sequenciamento em duas etapas, segundo Figura 21 (NAKASU, 2015).

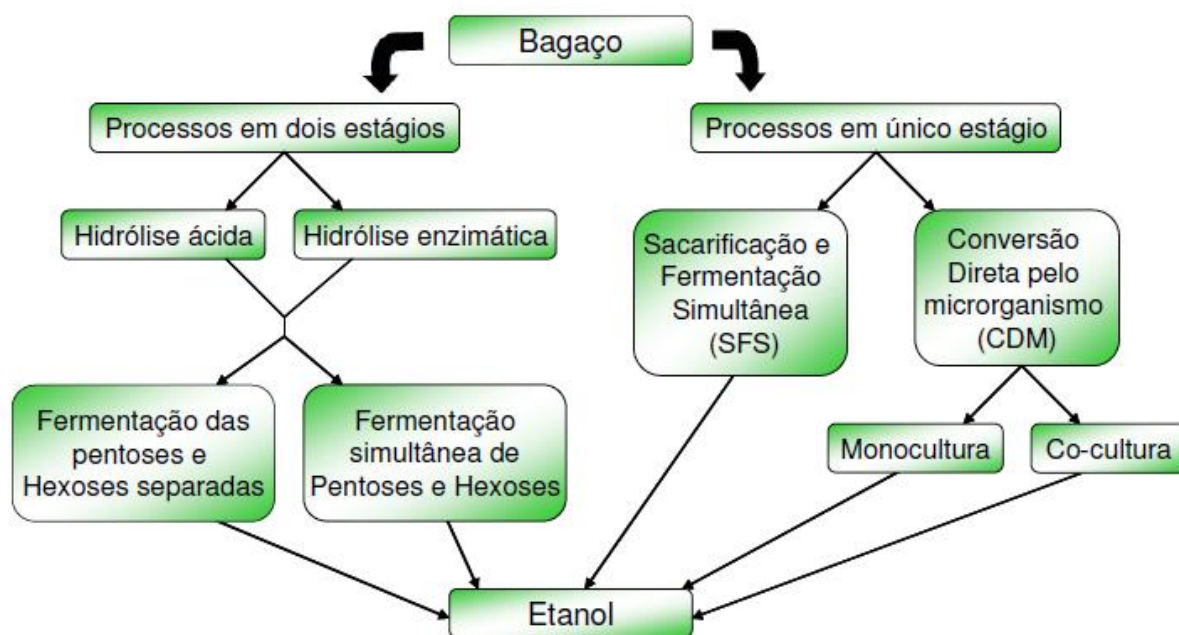


Figura 21. Rotas de hidrólise e fermentação (OGIER, 1999, DOMINGUEZ, 2003 apud NAKASU, 2015).

Para o controle das condições operacionais o aspecto que tem apontado maior flexibilidade é o processo em duas etapas, em que a sacarificação (ácida ou enzimática) e fermentação são realizadas separadamente (HFS). A vantagem deste processo é que, ao estar separadas, a etapa de hidrólise e fermentação podem ser realizadas nas condições ótimas (RABELO, 2010). Na hidrólise enzimática, a temperatura considerada ótima é a da enzima (em torno dos 50°C), enquanto que a temperatura ótima da fermentação se dá pelo microrganismo produtor de etanol (30-34°C). A principal desvantagem do processo de HFS é a inibição das enzimas envolvidas no processo pela ação do produto final, como descrito anteriormente, levando a baixos rendimentos em etanol (SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996).

Em processos em um único estágio, a hidrólise e a fermentação ocorrem em um mesmo reator. A principal vantagem deste processo é a redução da inibição pelo produto final que ocorre na operação em duas etapas, já que a presença de microrganismos fermentativos junto com as enzimas celulolíticas reduz o acúmulo de açúcar no fermentador (RABELO, 2010). Desta forma consegue-se maiores taxas de hidrólise e porcentagens de conversão em comparação ao processo HFS, sendo

necessária uma menor quantidade de enzimas para se obter um aumento dos rendimentos de etanol. A desvantagem deste processo está relacionada com as diferentes condições ótimas de pH e temperatura nas etapas de hidrólise e fermentação. Sendo assim, se faz necessário realizar o processo numa condição adaptável com as duas etapas.

2.6.1 Leveduras fermentoras de pentoses e hexoses

A fermentação é um processo anaeróbio de bioconversão de açúcares para a produção de etanol, CO₂ e outros compostos. Para tanto, pode-se utilizar diversas matérias-primas, processos e métodos, que resultarão em tecnologias conhecidas como de primeira e segunda geração.

De modo geral, a produção de etanol de primeira geração utiliza matérias-primas ricas em carboidratos, sendo o principal microrganismo fermentador a *Saccharomyces cerevisiae*, que apresenta habilidade para metabolizar hexoses, sob condições de elevadas concentrações osmóticas, baixos valores de pH, tolerando altas concentrações de etanol na fase final do processo. Entretanto, esta levedura é incapaz de fermentar pentoses como a xilose, principal produto obtido a partir do pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos, que é a principal matéria-prima para a produção do etanol de segunda geração (MATSUSHIKA, et. al., 2009).

A xilose é a pentose presente em maior quantidade na biomassa lignocelulósica das gramíneas e o segundo carboidrato mais abundante na natureza (MATSUSHIKA et al., 2009). Neste contexto, a produção de etanol de segunda geração depende da eficiente metabolização das pentoses pelos microrganismos fermentadores.

A xilose é metabolizada por uma série de enzimas no interior da célula, conforme Figura 22. Inicialmente, a xilose é transportada através da membrana plasmática, sendo a seguir convertida a xilulose através de redução da xilose a xilitol, mediada pela xilose redutase (XR) e ainda a xilitol desidrogenase (XDH) que oxida o xilitol à xilulose (JIN e JEFFRIES, 2004 apud PROMPT, 2012). A conversão a xilulose pode ocorrer de modo direto através da ação da enzima xilose isomerase (XI). Na sequência, a xilulose é fosforilada, mediada pela enzima xilulocinase (XK),

resultando na xilulose-5-fosfato, que entra na Via das Pentoses-fosfato que alimenta a Via glicolítica (Glicólise) resultando na formação de etanol.

De acordo com Eliasson et al. (2000) e Richard, Toivari, Penttilä (2000), embora a *S. cerevisiae* não tenha habilidade para utilizar a xilose, pode metabolizar o produto da isomerização a xilulose. Entretanto, o metabolismo deste isômero é muito lento em função da baixa atividade da enzima xilulocinase (XK) (DEN e HO, 1990). Esta incapacidade da *S. cerevisiae* em metabolizar a xilose é resultado da baixa expressão dos genes que codificam as enzimas que promovem a isomerização da xilose a xilulose (XR e XDH) e sua posterior fosforilação pela XK (Toivari et al., 2004 apud Prompt, 2012).

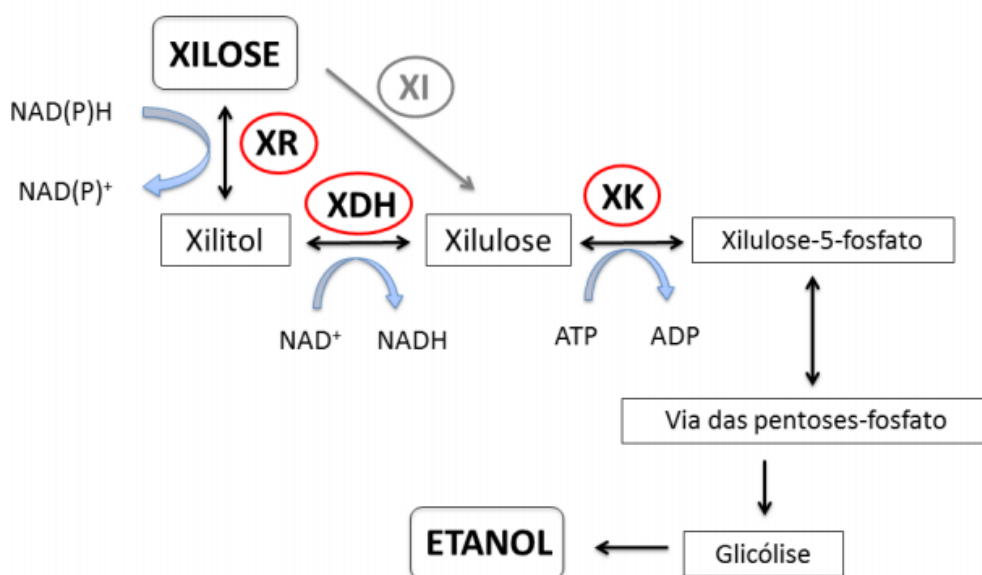


Figura 22. Esquema simplificado do metabolismo de xilose até etanol por leveduras. Fonte: Prompt, 2012.

De acordo com Jeffries et al. (2007) outras espécies de leveduras, como *Candida succiphila*, *C. jeffriesii*, *C. intermedia*, *Pichia stipitis*, *Pichia tannophilus* dentre outras têm sido relatadas por apresentar habilidade de metabolizar xilose produzindo etanol.

A levedura *Pichia kudriavzevii*, anteriormente conhecida como *Issatchenkia orientalis* e *Candida krusei*, tem se mostrado promissora para a fermentação de pentoses e hexoses (PAGNOCCA, 2015).

Esta levedura apresenta melhores processos de exportação de ácidos orgânicos e o pH intracelular mais eficazmente do que a *Sacharomyces cerevisiae*. A *P. kudriavzevii* é um excelente microrganismo de produção não só para produtos tradicionais como o etanol, mas também tem sido investigada pela capacidade de produzir D-xilano em hidrolisados hemicelulósicos. Foi descrita como um organismo robusto, sendo boa fermentadora de xilose, e tolerante à presença de compostos inibidores gerados a partir da hidrólise da biomassa lignocelulósica, apresentando-se com tolerância multi-stress a pH baixo, altas concentrações de sais e temperaturas de até 42°C (ISONO et al., 2012).

As hexoses (glicose, galactose e manose) são facilmente fermentadas para a produção de etanol, enquanto que as pentoses (xilose e arabinose) necessitam de algumas estirpes nativas ou de microrganismos geneticamente modificados (OGM) para a fermentação e ainda assim baixos rendimentos são obtidos. Os microrganismos de fermentação de xilose possuem produção comercial limitada devido a sua sensibilidade aos inibidores e baixa tolerância ao etanol. No entanto, como a fermentação das pentoses é mandatória para se ter produto economicamente viável, estirpes gênicas de bactérias e leveduras tem sido combinada para melhorar o rendimento (LIISA et al., 2013; MAITAN-ALFENAS; VISSER; GUIMARÃES, 2015).

De acordo com relatos de Giese et al. (2011), embora existam diversos métodos e processos para a obtenção de etanol a partir de biomassa, ainda se encontra dificuldade em se obter etanol lignocelulósico de maneira econômica.

A Via das Pentoses Fosfatos (VPF) é a rota bioquímica para metabolismo da xilose, sendo encontrada em todos os organismos (JEFFRIES, 2006). Em leveduras é a principal via de formação de NADPH, coenzima necessária para a biossíntese de constituintes celulares como proteínas, lipídeos, DNA e RNA (KRUGER e VON SCHAEWEN, 2003 apud PROMPT, 2012). É a possibilidade que a levedura tem para introduzir a xilulose-5-fosfato na Via Glicolítica e produzir etanol e outros metabólitos intermediários (MATSUSHIKA, et al. 2009). Assim, através de reações não oxidativas a X5F (produto da enzima XK) pode ser convertida em gliceraldeído-3-fosfato (GA3P) e frutose-6-fosfato (F6P), produtos intermediários da Via Glicolítica. Segundo Campbell (2000), uma vez que estas vias metabólicas (VPF e Glicolítica)

se intercalam nesses metabólitos, estes intermediários produzidos a partir da xilose podem ser, em teoria, convertidos a etanol.

A Glicólise ou Via Glicolítica é a principal rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica, que é comumente encontrada em todos os organismos, sendo que nas leveduras (organismo eucarioto) ela ocorre no citoplasma.

Nesta via ocorre a metabolização da glicose, com a formação de duas moléculas de piruvato, sendo as reações mediadas por diversas enzimas, com a liberação de energia na forma de ATP, conforme Figura 23

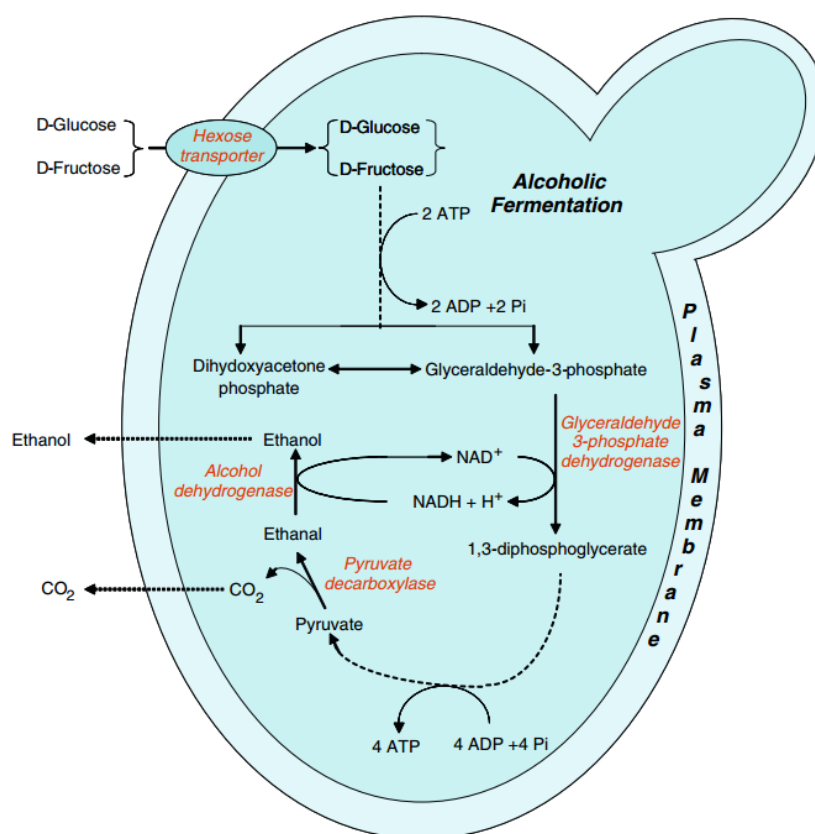


Figura 23. Reações bioquímicas da via glicolítica em leveduras. Fonte: Zamora (2009).

A Glicólise inicia-se através da fosforilação da glicose logo após sua entrada na célula, resultando na glicose-6-fosfato (G6P), sendo esta reação mediada por uma enzima hexocinase, com o consumo de uma molécula de ATP. Após essa reação a fosfoglicose isomerase transforma a glicose-6-fosfato no seu isômero

frutose-6-fosfato (F6P), por ação da enzima fosfoglicose isomerase (LEHNINGER et al., 2015).

Finalmente a F6P recebe mais um grupamento fosfato e é transformada no composto frutose-1,6-bisfosfato, sendo esta reação irreversível e catalisada pela fosfofruto-cinase. Na sequência, ocorre a quebra desta hexose em duas trioses fosfatos: Dihidroxicetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, que é oxidado a 1,3-difosfoglicerato, mediado pela enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase. Esta reação envolve a redução do NAD⁺ a NADH com o objetivo de estabelecer o equilíbrio redox. (ZAMORA, 2009 apud PROMPT, 2012).

Em seguida ocorre a reação do 1,3-difosfoglicerato que é convertido a 3-fosfoglicerato, com a liberação de uma molécula de ATP. Este composto é transformado em 2-fosfoglicerato e desidratado a fosfoenolpiruvato, por uma enzima enolase. O fosfoenolpiruvato é então convertido a piruvato, que é o produto final da glicólise, pela fosforilação de ADP em ATP (ZAMORA, 2009).

No processo fermentativo destinado à produção de etanol este é formado a partir da descarboxilação do piruvato, formando o aldeído acético (etanal), que é reduzido a etanol pelo NADH, através da ação da enzima álcool desidrogenase, regenerando o NAD⁺ (LEHNINGER et al., 2015).

Durante a ocorrência das reações relacionadas ao processo fermentativo são formados diversos subprodutos, tais como glicerol, ácidos, álcoois superiores, ácidos graxos, ésteres, dentre outros, sendo o glicerol produzido em maior quantidade. Sua produção é inversamente proporcional à de produção do etanol provocando uma redução na eficiência do processo. A formação do glicerol depende do tipo de levedura utilizada, da pressão osmótica do meio de cultura, da formação de ácidos orgânicos (succínico e acético) e do crescimento da levedura (LEHNINGER et al., 2015).

As reações bioquímicas da via glicolítica em leveduras destacando a formação de subprodutos estão apresentadas na Figura 24.

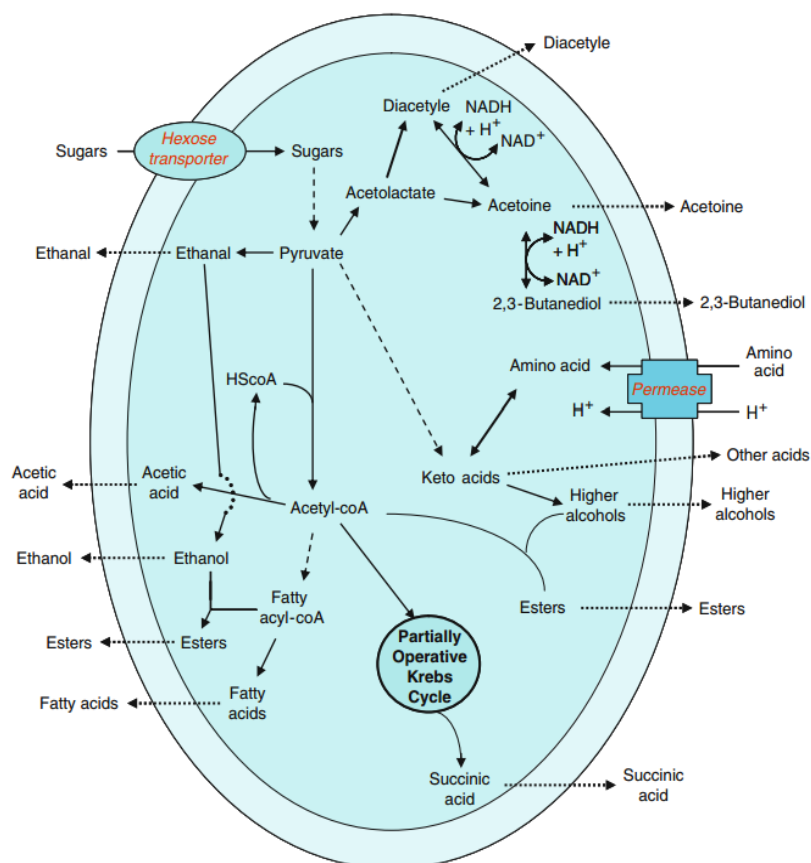


Figura 24. Reações bioquímicas da via glicolítica em leveduras indicando a formação de subprodutos. Fonte: Zamora (2009).

2.7 Perspectivas da Produção de Etanol Celulósico no Brasil

Para atingir a marca de 10 bilhões até 2025, o Brasil precisa avançar na moagem de cana e na modernização e integração das produções de etanol de primeira e segunda geração nas usinas existentes (UNCTAD, 2016).

Não obstante, o Brasil possui a melhor tecnologia de produção de etanol combustível, levando-se em consideração o balanço energético altamente positivo do processo, desde o cultivo da cana-de-açúcar à fermentação da sacarose. Neste sentido é essencial que haja investimentos na área tecnológica no que diz respeito aos procedimentos industriais para a fermentação de fontes alternativas de açúcares fermentescíveis (REIS, 2014). O país ainda não apresenta capacidade de suprir suas necessidades devido a uma indisposição acentuada pela demanda de

exportação de etanol. A solução para suprir as demandas internas está em acentuar o conceito de biorrefinaria, de onde podem ser aproveitados vários tipos de açúcares com aplicações tecnológicas e consumos diferentes, associadas à indústria sucroalcooleira, gerando novos produtos e aumentando a produção de etanol (RABELO, 2010).

A utilização de fontes renováveis provenientes do próprio processo industrial, como o bagaço de cana-de-açúcar, está em expansão e sinaliza tanto para a utilização de leveduras com capacidade de fermentar oligômeros da celulose, tais como a celobiose, quanto para a modificação e clonagem de genes codificadores de proteínas celulolíticas (REIS, 2014).

Burnquist (2007) destaca a importância das vantagens dos custos de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar no Brasil, diante das características edafoclimáticas somadas ao domínio da tecnologia de produção, disponibilidade de matéria-prima, baixo custo de obtenção, sustentável e com agressividade ambiental praticamente nula. Entretanto, apresentando-se vantajoso nos custos de produção, o etanol de cana-de-açúcar vive uma crise devido, principalmente, a não expansão dos processos fermentativos que terminam por depender de apenas uma fonte e que ainda apresenta o agravante de ter que ser segregado à produção de açúcar.

Desta forma, o sorgo surge como cultura energética, que apresenta potencialidades atraentes como matéria-prima. Como principais características para aplicação industrial e produção de bioenergia destacam-se a eficiência no uso da água (1/3 da cana-de-açúcar e 1/2 do milho) e apresenta gama alargada de requisitos que o tornam produtivo em climas temperados e mediterrânicos (FREITA, 2013).

A produção de E2G é recomendada como uma utilização promissora do bagaço de sorgo, devido à elevada produção por hectare e aos custos de produção mais baixos, quando comparados com outras culturas (GOSHADROU et al., 2011).

Em geral, os materiais lignocelulósicos apresentam uma estrutura complexa e compacta sendo necessário submeter esta biomassa a pré-tratamentos físicos e/ou químicos antes da sua hidrólise para produção de etanol. Esta etapa é responsável pela remoção de lignina e hemicelulose, redução da cristalinidade da celulose e aumento da porosidade do material, de maneira a tornar a celulose susceptível à hidrólise (RABELO, 2010).

3.0 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 Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Campinas – São Paulo e na Escola de Engenharia de Lorena (EEL), USP – Lorena – São Paulo.

3.1 Sorgo

Para o estudo de produção de E2G foram utilizados três genótipos de sorgo: BRS610 (sorgo forrageiro), BRS508 (sorgo sacarino) e BD7605 (sorgo biomassa).

O genótipo BRS610 e o BRS508 foram cultivados na área experimental do departamento de Produção Vegetal da FCAV- Jaboticabal, sendo o forrageiro na safra 2011/2012, com plantio em 14 de dezembro do ano de 2011 e o sacarino na safra 2013, com plantio em 03 de janeiro do ano de 2013. O município de Jaboticabal - SP situa-se a nordeste do Estado de São Paulo, inserido no Planalto Ocidental Paulista (21° 17' a 21° 18' de latitude sul e 48° 08' a 48° 10' de longitude oeste), com altitude média de 583 metros. O relevo é predominantemente suave ondulado a ondulado, com altitude média de 600 m. Segundo a classificação climática de Köppen, apresenta clima subtropical com inverno seco (Cwa), com precipitação média anual de aproximadamente 1.600 mm, com distribuição concentrada no período de outubro a março e relativa seca no período de abril a setembro (MONTANARI et al., 2012).

O espaçamento utilizado para ambas as semeaduras foi de 45 cm entre linhas. Após a previa análise de solo foi feita a adubação de plantio de 36-126-72 kg.ha⁻¹ de N, P₂O₅-K₂O, empregando-se a fórmula 8-28-16, com intuito de obter alta produtividade. O plantio foi realizado com distribuição manual no sulco de plantio, de 15 sementes por metro, cobertas com camada de solo de 2 a 3 cm. Aos 15 dias após semeadura (d.a.s.), realizou-se o desbaste, mantendo-se 6 plantas por metro, para obter-se o estande final de 120.000 plantas.ha⁻¹. Durante o período

experimental foi feito o tratamento fitossanitário, para garantir a manutenção da sanidade da cultura. Para controle da lagarta do cartucho aos 22 d.a.s. aplicou-se 250 mL.ha⁻¹ de Tiametoxam + Lambda cialotrina. Realizou-se também a capina manual mantendo-se a cultura livre de plantas infestantes, ao longo de todo o ciclo.

O genótipo biomassa 7605 foi cultivado em Ribeirão Preto (sede da APTA Regional Centro Leste), em solo classificado como latossolo vermelho eutroférico. A semeadura foi realizada no dia 15 de dezembro de 2014 utilizando-se semeadora (marca TATU Marchesan modelo PST-2) com 8 linhas espaçadas a 0,45 m. Foram aplicados 28, 98 e 56 kg ha⁻¹ de N, P₂O₅ e K₂O através do fornecimento de 350 kg ha⁻¹ da fórmula 8-28-16.

Foram coletados 25 colmos integrais (colmo + folhas) e 25 colmos limpos (sem folhas). Estes foram encaminhados para o Laboratório de Tecnologia do Açúcar e Álcool e Microbiologia das Fermentações FCAV-UNESP, sendo pesados e submetidos à extração do caldo utilizando-se de moenda de laboratório.

Após moagem, os bagaços foram coletados e mantidos em estufa com circulação de ar a 60°C até atingir massa constante. A umidade contida nos bagaços de sorgo foi determinada por exposição do material à radiação infravermelha, em um aparelho (SARTORIUS, modelo MA 35) à temperatura de 105°C durante 2 a 4 minutos, e estes foram em seguida armazenados no departamento de produção vegetal da FCAV/UNESP em saco plástico, para futuras aplicações no processo de pré-tratamento e subsequente hidrólise enzimática e fermentação.

3.2 Condições do teste preliminar do pré-tratamento

Os ensaios iniciais de pré-tratamento foram realizados utilizando a condição padrão do bagaço de cana, previamente estabelecida pelo CTBE (140°C, 15 min, 0,5% (v/v)). Os resultados de cromatografia mostraram que a condição de pré-tratamento se mostrou severa para as biomassas estudadas. Neste sentido, foi definido estudar as condições operacionais como tentativa de estabelecer uma melhor condição de pré- tratamento para o bagaço de sorgo.

Para os ensaios de pré-tratamento em reatores de escala laboratorial (CTBE) foi realizado um planejamento de experimentos fatorial linear, com 3 repetições no

ponto central, onde foram estudadas 3 variáveis do processo: tempo reacional (h), temperatura (°C) e concentração do ácido sulfúrico (% v/v), sendo utilizadas as mesmas condições operacionais para as 3 biomassas. A Tabela 03 apresenta as condições operacionais estudadas.

Tabela 03. Matriz do planejamento fatorial 2^3 para avaliação da influência das variáveis: tempo, temperatura e concentração de ácido dos bagaços de sorgo.

| Ensaio | Tempo (min.) | Temperatura (°C) | Concentração de H ₂ SO ₄ (%, v/v) |
|--------|--------------|------------------|---|
| 1 | 10 | 120 | 0,2 |
| 2 | 20 | 120 | 0,2 |
| 3 | 10 | 140 | 0,2 |
| 4 | 20 | 140 | 0,2 |
| 5 | 10 | 120 | 0,5 |
| 6 | 20 | 120 | 0,5 |
| 7 | 10 | 140 | 0,5 |
| 8 | 20 | 140 | 0,5 |
| 9 | 15 | 130 | 0,35 |
| 10 | 15 | 130 | 0,35 |
| 11 | 15 | 130 | 0,35 |

O processo foi realizado em reator de aço inoxidável de capacidade total de 500 mL com uma concentração de sólidos de 10% (m/v). Após cada reação, a fração líquida, correspondente ao hidrolisado hemicelulósico dos bagaços de sorgo foi separada do resíduo sólido (celulignina) por filtração, e foi mantida em câmara fria (4°C) até sua posterior caracterização.

3.2.1 *Scaling up* do processo

Após estudos iniciais das condições operacionais, o bagaço de sorgo de cada um dos genótipos foi pré-tratado para obtenção das correntes sólidas e líquidas, para utilização nas etapas de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica. Como há

diferença nas rampas de aquecimento e resfriamento dos reatores em escala de laboratório (CTBE) e piloto (USP-Lorena), as condições operacionais precisaram ser ligeiramente alteradas. A reação foi realizada na USP- Lorena, em um reator de aço inoxidável com capacidade de 40 L, a 120°C, 20 minutos, 0,5% (m/v) de ácido sulfúrico, 10% sólidos (m/v). Ao final da reação, a fração líquida, correspondente ao hidrolisado hemicelulósico, foi separada da fração sólida (celulignina) por filtração. A celulignina foi lavada com água em abundância, depois seca em estufa a 60°C e armazenada para futuras aplicações em processo de hidrólise enzimática e subsequente fermentação.

3.2.2 Concentração e destoxificação do hidrolisado hemicelulósico

Os licores obtidos após o pré-tratamento ácido diluído em escala piloto em reator de 40 L (USP-Lorena), foram concentrados em rotaevaporador de simples efeito a 60°C com sistema de vácuo a 635mmHg, com a intenção de aumentar a concentração dos açúcares fermentescíveis no meio. Em seguida estes licores foram destoxificados segundo metodologia descrita por Marton (2002). Este processo objetivou a retirada de compostos inibitórios que poderiam interferir no desempenho das leveduras na fermentação.

Para destoxificação os pHs dos hidrolisados foram ajustados para 7,0 com a adição de uma solução de óxido de cálcio (CaO), seguido de centrifugação (centrífuga Himac CR21G), por 5 min, a 30°C e rotação de 2500g. Após a centrifugação, o pH do sobrenadante foi reduzido até 4,0 com a adição de uma solução de ácido fosfórico (H₃PO₄) (1M), realizando-se nova centrifugação para remoção do precipitado. Ao licor sobrenadante foi adicionado 1% (m/v) de carvão ativo, e este mantido em estufa a 50°C, por 30 min. Ao final do processo o material foi filtrado para remoção do carvão ativado e armazenado para posterior ensaio de fermentação.

3.2.3 Isolamento da levedura

As amostras de cada camada do solo foram coletadas em ecossistema de produção de sorgo sacarino localizado em área experimental do departamento de Produção Vegetal da FCAV- Jaboticabal, no dia 30 de Setembro de 2014, no período matutino, à temperatura média de 23,9°C, após leve precipitação pluviométrica no dia da coleta e ocorrência de precipitação em dias anteriores, de acordo com a Estação Agroclimatológica da FCAV- Jaboticabal (HOLLUPI, 2015).

Para o isolamento da levedura, foi utilizado o meio seletivo WLN por um período de 48 h a 20°C, que serve para enumerar e isolar leveduras totais, preparado com a seguinte composição: glicose - 5,00 g; caseína - 0,50 g; extrato de levedura - 0,40 g; ágar - 2,00 g; *KH₂PO₄ -55,00 mg; *KCl - 42,50 mg; *CaCl₂.2H₂O - 12,50 mg; *MgSO₄7H₂O - 12,50 mg; *FeCl₃.6H₂O - 0,25 g; *MnSO₄.4H₂O - 0,25g; *verde de bromocresol - 2,20 mg; *ácido nalidíxico - 5,00 mg; *ampicilina - 5,00 mg; água destilada q.s.p - 100,00 mL. As substâncias assinaladas com asteriscos foram incorporadas ao meio na forma de solução. O pH=5,5 do meio foi devidamente ajustado com HCl – 1N (GREEN; GRAY 1950, apud OLIVEIRA; PAGNOCCA, 1988).

3.2.4 Purificação

A estirpe de levedura isolada do meio WLN foi transferida para o meioGYMC: glicose – 2,00 g; extrato de levedura – 0,50 g; extrato de malte – 1,00 g; fosfato de sódio monobásico - 0,20 g; ágar – 1,70 g; água destilada q.s.p – 100 mL (LODDER, 1970). Neste meio, realizaram-se diluições sucessivas até 10⁻⁵, com plaqueamento em duplicata, objetivando-se a formação de apenas um tipo de colônia. Após a purificação no meio GYMP, a levedura foi transferida para tubos inclinados contendo o meio GYMP: glicose – 2,00 g; extrato de levedura – 0,50 g; extrato de malte – 1,00 g; fosfato de sódio monobásico - 0,20 g; ágar – 1,70 g; água destilada q.s.p – 100 mL (LODDER, 1970). Após um período de crescimento de 24 a 48 horas a 28°C, os tubos foram armazenados sob refrigeração, para posterior utilização.

3.2.5 Teste de crescimento em diferentes temperaturas

O meio utilizado para teste de crescimento em diferentes temperaturas foi: glicose– 2,00 g; peptona 0,75 g; extrato de levedura 0,45 g; água destilada q.s.p – 100 mL (WICKERHAM 1951 apud VAN DER WALT; YARROW, 1984). Os tubos de ensaio, autoclavados, contendo 3 mL do meio foi inoculado com 0,1 mL de suspensão celular estirpe de levedura, sendo incubado respectivamente nas temperaturas de 35°C, 37°C e 40°C. A avaliação foi realizada após três dias de incubação, colocando-se atrás de cada tubo, um cartão de Wickerham (1951) contendo traços com três espessuras distintas, verificando-se a visibilidade apresentada na Figura 25.

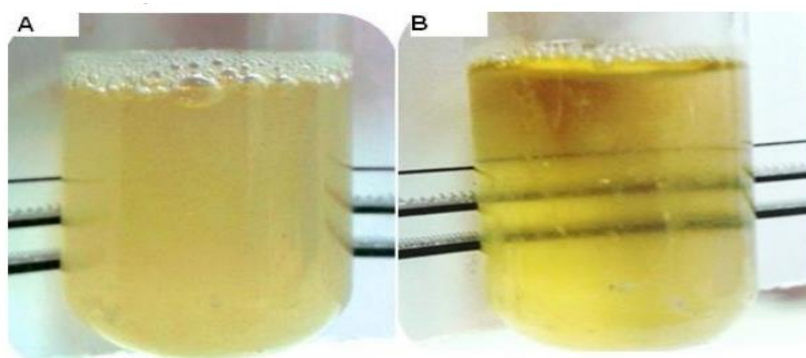


Figura 25. Tubos de ensaio contendo meio para teste de crescimento em diferentes temperaturas (A: resultado positivo; B: resultado negativo). **Fonte:** Imagem da pesquisa.

3.2.6 Assimilação de fontes de carbono

3.2.6.1 Meio de inoculação preliminar

Os meios de inoculação preliminar para testes de assimilação de fontes de carbono foram realizados conforme descrito: Bacto Yeast Nitrogen Base – 6,70 g; glicose – 1,00 g; água destilada q.s.p – 100 mL (WICKERHAM, 1951 apud VAN DER WALT; YARROW, 1984). As soluções de Bacto Yeast Nitrogen Base e a solução de glicose foram esterilizadas por filtração em membrana de Millipore e

estocadas sob refrigeração. O meio preparado para uso, foi diluído em alíquotas de 0,5mL em 4,5 mL de água destilada estéril. Este meio foi inoculado com 0,1 mL de suspensões celulares provenientes do meio de GYMP, sendo mantido a 25°C por 48 h. Após este período, realizou-se contagem na câmara de Neubauer. Sendo a concentração ideal entre 10^5 e 10^6 células/mL, as quais, foram ajustadas com diluição com o meio de inoculação preliminar.

3.2.6.2 Meio de assimilação de fonte de carbono

O meio basal de nitrogênio para avaliação de assimilação de fonte de carbono em meio líquido: Bacto Yest Nitrogen Base – 6,70g; fonte de carbono– 5,00 g; água destilada q.s.p – 100 mL (WICKERHAM; BURTON, 1948; WICKERHAM, 1951; LODDER; KREGER VAN-RIJ, 1952 apud van der WALT; YARROW, 1984). As fontes avaliadas foram: glicose, sacarose, frutose, xilose, arabinose e rafinose. O meio Bacto Yest Nitrogen Base concentrado 10 vezes, juntamente com cada uma das fontes de carbono avaliadas foram preparados e esterilizados em membrana Millipore. Para uso, alíquotas de 0,5mL do meio concentrado foram pipetadas assepticamente, em tubos de ensaio esterilizados contendo 4,5mL de água destilada estéril. Os tubos, contendo o Meio basal de Nitrogênio e Carbono, com suas respectivas fontes de carbono, foram inoculados com alíquotas de 0,1 mL do pré-inóculo. Procedeu-se a incubação a temperatura entre 25°C e 28°C por 21 dias.

O crescimento foi avaliado de acordo com a visibilidade de três traços de diferentes espessuras contidos no cartão de Wickerham (1951) colocado atrás dos tubos, conforme Figura 26.

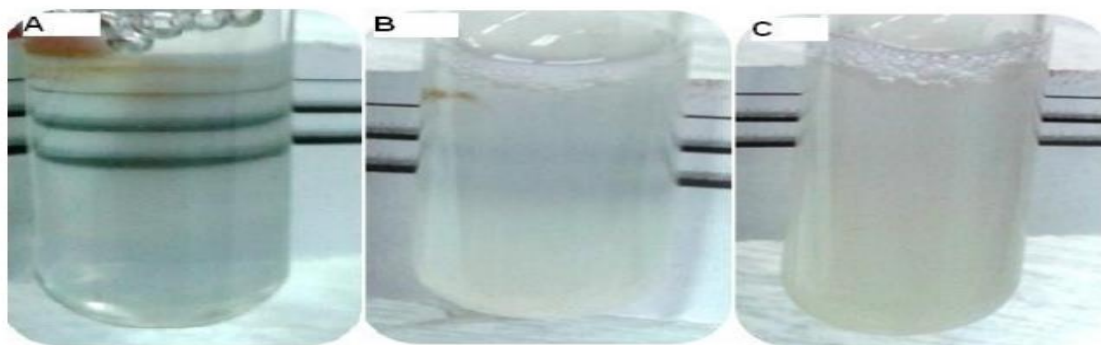


Figura 26. Teste de assimilação de fonte de carbono (A: crescimento negativo; B: crescimento moderado ou lento; C: crescimento intenso). **Fonte:** Imagem da pesquisa.

3.2.6.3 Identificação da levedura

As análises foram realizadas pela empresa Helixxa Serviços Genômicos Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento, localizada em Paulínia-SP, de acordo com a metodologia descrita: a extração de DNA foi realizada com o kit Reliaprep gDNA Tisse (Promega), conforme protocolo indicado pelo fabricante, e o gDNA obtido foi quantificado por espectrofotometria UV-Vis no aparelho Nanodrop (Thermo Scientific). Para a amplificação foi utilizado um par de primers degenerados (WHITE et al., 1999; TOJU et al., 2012) desenhados para abranger a região ITS1—ITS4 (ITS1 F e ITS4 R). O fragmento amplificado foi purificado a partir do gel de agarose 1% e o sequenciamento foi realizado por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), utilizando o Kit BigDye® Terminator.1 Cycle Sequencing. As sequências foram alinhadas e comparadas com a base de dados NCBI pela Internet utilizando a Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico (ALTSCHUL et al., 1997). As sequências foram alinhadas e comparadas com a banco de dados GenBank disponível no NCBI, utilizando a Ferramenta BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997).

3.2.6.4 Reativação das culturas e crescimento de massa celular

Para a reativação da cultura foi transferida para tubo de ensaio estéril, contendo aproximadamente 5 mL de meio GYMP (LODDER, 1970), composto por 20g/L de xilose, 5g/L de extrato de levedura, 10g/L de extrato de malte, 2g/L de fosfato de sódio monobásico e 17g/L de ágar, mantidos por 72 h a 30°C.

Após a reativação, iniciou-se o crescimento de massa celular, através da transferência de uma quantidade de microrganismo (alçada) para erlenmeyers com 200mL de meio GYMP líquido autoclavado, composto pelos mesmos componentes (exceto o ágar). A seguir incubou-se sob agitação orbital de 90rpm, por 72 horas e temperatura de 30°C. Ao final de cada etapa de crescimento celular, centrifugou-se para recuperação das células e armazenamento da levedura.

3.3 Fermentação da fração C5 (pentoses)

Os licores destoxificados foram suplementados com sulfato de amônio (0,1 g/L), fosfato de sódio (0,1 g/L), sulfato de magnésio (0,3g/L), sulfato de manganês (0,3g/L) e sulfato de zinco (0,001g/L). Em seguida, preparou-se o meio sintético de xilose (controle) (5 g/L de xilose e 110 mL água destilada – ultra pura) sem adição dos nutrientes.

O delineamento experimental utilizado foi o Inteiramente Casualizado (DIC) com parcelas subdivididas, sendo as parcelas constituídas pelos Tratamentos Principais (Genótipos de Sorgo) e os Tratamentos Secundários (Tempos de Fermentação). Os Tratamentos Principais foram constituídos pelo bagaço de 3 genótipos de sorgo (BRS508 - sacarino, BRS610 - forrageiro e BD7605 - biomassa) e o controle (meio de xilose). Os Tratamentos Secundários foram constituídos pelos seis períodos de avaliação da fermentação (0, 6, 12, 24, 48 e 72 h), com três repetições.

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 110 mL de mosto, inoculado com células de leveduras LJ3 na concentração de 10^7 células/mL. A levedura apresentou viabilidade celular superior a 89% antes de iniciar o processo fermentativo. A alimentação com mosto foi realizada em duas etapas,

adicionando-se 55 mL de mosto à levedura previamente adaptada a este mosto, completando-se o volume após 1 h. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital 160 rpm a 30°C, por um período de 72 h. Após inoculação, foram realizadas contagens de células de leveduras em Câmara de Neubauer em cada tempo de coleta (0, 6, 12, 24, 48 e 72 h) segundo Lee et al., (1981), quantificando-se viabilidade celular das leveduras, viabilidade de brotos e índice de brotamentos. ao final da fermentação, os vinhos foram centrifugados a 1650g, 25°C, por 5 min utilizando uma centrífuga (HIMAC CR 21G).

A eficiência das fermentações foi calculada com base no rendimento teórico de uma fermentação alcoólica (0,511g de etanol por g de xilose consumida), de acordo com a equação:

$$Eficiência [\%] = \frac{Etanol\ produzido\ (g.L)}{Xilose\ inicial - Xilose\ final\ (g.L)} \cdot 100$$

3.4 Hidrólise enzimática

3.4.1 Determinação da atividade enzimática

Antes de iniciar o estudo aplicando a enzima celluclast[®] 1.5L (Novozymes, lote: CCN03129), foram realizados ensaios para determinação da atividade enzimática, no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE). A atividade foi determinada como atividade de papel de filtro e expressa em unidades de papel de filtro (FPU) (em inglês, Filter Paper Units) por volume de enzima original, como recomendado pela IUPAC (ADNEY e BAKER, 1996; GHOSE, 1987).

3.4.2 Hidrólise enzimática

Após o pré-tratamento ácido diluído em escala piloto em reator de 40 L (USP-Lorena), os bagaços de todos os genótipos de sorgo foram secos ao ar livre e em seguida submetidos a hidrólise enzimática em reator de aço inoxidável com capacidade de 7 L, a 50°C e agitação de 23,5Hz, por 72 h (Figura 27). A reação foi

realizada a uma concentração de sólidos de 20% (m/v), utilizando tampão citrato 0,05M, pH 4,8, e uma carga enzimática de 15 FPU/g biomassa pré-tratada.



Figura 27. Reator aço inoxidável com capacidade de 7L. (Fonte: CTBE).

Durante a hidrólise de cada biomassa, amostras foram retiradas em tubo falcon de 15 mL ao longo do tempo (0, 6, 12, 24, 48 e 72 h). A cada coleta os tubos eram colocados em um banho de gelo fundente com o intuito de parar a reação. Em seguida cada tubo foi centrifugado a 2500g por 5 min. O sobrenadante foi armazenado a -4°C para subseqüentes quantificações dos açúcares (glicose, celobiose e xilose) por HPLC.

3.4.3 Fermentação da fração C6

O delineamento experimental utilizado foi o Inteiramente Casualizado (DIC) com parcelas subdivididas, sendo as parcelas constituídas pelos Tratamentos Principais (Genótipos de Sorgo) e os Tratamentos Secundários (Tempos de Fermentação). Os Tratamentos Principais foram constituídos pelo bagaço de 3 genótipos de sorgo (BRS508 - sacarino, BRS610 - forrageiro e BD7605 - biomassa).

Os Tratamentos Secundários foram constituídos pelos seis períodos de avaliação da fermentação (0, 4, 8, 12, 20 e 24 h), com três repetições.

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 150 mL contendo 110 mL de mosto, inoculado com células de leveduras Pedra 2 (PE-2, Fonte: LNF), na concentração de 10^7 células/mL. A levedura apresentou viabilidade celular superior a 91%. A alimentação com mosto foi realizada em duas etapas, adicionando-se 55mL de mosto à levedura previamente adaptada, completando-se o volume após 1 hora. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital 160 rpm a 30°C, por um período de 72 horas. Após inoculação com 0, 4, 8, 12, 20 e 24 h foram realizadas contagens de células de leveduras em Câmara de Neubauer, segundo Lee et al., (1981), quantificando-se viabilidade celular das leveduras, viabilidade de brotos e índice de brotamentos. A fermentação durou 24 h, sendo os vinhos centrifugados a 1650g, 25°C, por 5 min (centrífuga HIMAC CR 21G).

A eficiência das fermentações foi calculada com base no rendimento teórico de uma fermentação alcoólica (0,511g de etanol por g de glicose consumida), de acordo com a equação:

$$Eficiência [\%] = \frac{Etanol\ produzido\ (g.L)}{Glicose\ inicial - Glicose\ final\ (g.L)} \cdot 100$$

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Análises químicas das biomassas

Para análise da composição química dos bagaços *in-natura*, material pré-tratado e resíduo obtido após a etapa de hidrólise enzimática, foi utilizado a metodologia descrita por Sluiter et al., 2016.

Certa quantidade de cada biomassa foi passada por um moinho de facas (marca Fritsch, modelo pulverisette 14) até conseguir um material com partículas inferiores a 0,5 mm, selecionadas através de uma peneira de 20 mesh. Partículas retidas na peneira eram novamente moídas para que a composição química do material não fosse alterada. Após moagem dos materiais e separação

granulométrica, os bagaços *in-natura* foram analisados quanto ao teor de cinzas, extrativos, lignina total (lignina insolúvel + solúvel), celulose e hemiceluloses. Já para os bagaços após pré-tratamento e do hidrolisado enzimático foi analisado o teor de cinzas, lignina total (lignina insolúvel + solúvel), celulose e hemiceluloses.

O teor de umidade das amostras foi determinado utilizando-se uma balança Sartorius (modelo MA35) que realiza a secagem da amostra por radiação infravermelho direta. Para cada análise, cerca de 2,0 g de amostra foram pesados na balança, que foi aquecida a 105°C até massa constante. A balança forneceu a porcentagem de perda de massa que é relativa a massa úmida previamente pesada. Os valores de teor de umidade encontrados foram utilizados para a determinação da massa de amostra seca utilizada nas análises.

Materiais inorgânicos e orgânicos solúveis em água uma mistura de cicloexano e etanol constituem os extrativos e devem ser devidamente quantificados e removidos antes da caracterização de açúcares e lignina, pois acabam superestimando os valores de lignina insolúvel do material. O procedimento detalhado desta análise encontra-se no **Apêndice I**.

A quantidade de material inorgânico total no bagaço (cinzas estruturais e não estruturais) pode ser determinada como parte da composição total. O procedimento detalhado de análise do teor de cinzas encontra-se no **Apêndice II**.

Lignina e carboidratos perfazem a parte majoritária da composição do bagaço. Esses constituintes são quantificados após uma etapa de hidrólise ácida do material. O procedimento detalhado destas análises encontra-se no **Apêndice III**.

3.6 Determinação de carboidratos, aldeídos furânicos, ácidos orgânicos e produtos fermentativos por HPLC

As concentrações de açúcares (xilose, glicose, arabinose), ácido acético, glicerol e etanol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) segundo metodologia descrita por Pérez et al. (2016). Empregou-se cromatógrafo Agilent (Agilent Technologies, CA, USA) 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).

As concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural foram quantificadas por HPLC empregando um equipamento Waters, com detector de luz ultravioleta e coluna Waters Spherisorb C18, a 25°C, com acetonitrila:água (1:9) e ácido acético 1% como eluente, e fluxo de 0,8mL min⁻¹. As amostras foram diluídas com água deionizada e filtradas em membranas com poros de 0,45µ (Millipore). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

3.7 Determinações de macro e micronutrientes dos bagaços de sorgo

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. 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 NH₄⁺ 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; SALATI; MATSUI, 1973).

Potássio, cálcio, magnésio, ferro, manganês, ferro, cobre e zinco, foram determinados por digestão nitroperclórica, seguida da análise por espectrometria de absorção atômica (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

3.8 Determinação do valor energético bruto

O poder calorífico é definido como a quantidade de energia liberada na forma de calor (energia térmica), durante a completa combustão de um combustível.

Para a determinação do PCS foi utilizado uma bomba calorimétrica PARR

Modelo 1281 semiautomatizada, seguindo a norma 8633 da ABNT (1984).

O PCI foi determinado segundo o método de Doat (1977). Este foi calculado subtraindo-se do PCS o calor associado com a condensação do vapor de água formado pela reação do hidrogênio contido na biomassa. O PCU foi calculado em função da umidade, segundo Doat (1977).

As fórmulas empregadas para a realização dos cálculos referentes ao Poder Calorífico Inferior (PCI) e Poder Calorífico Superior (PCS) estão apresentadas a seguir:

$$\text{PCI} = [\text{PCS} - 600 (U + 9H)] / (1 + U)$$

Onde:

PCI = Poder Calorífico Inferior (cal.g^{-1})

PCS = Poder Calorífico Superior (cal.g^{-1})

U = Teor de Umidade do Material (%)

H = Teor de Hidrogênio (%)

600 = valor médio (cal) de energia absorvida por grama de água para se atingir a temperatura de evaporação

9 = múltiplo do peso de hidrogênio contido no material que fornece o peso da água formada durante a combustão

$$\text{PCU} = \{[\text{PCI} - (6 \times W)] / (100 + W)\} \times 100$$

Onde:

PCU = Poder Calorífico Útil

PCI = Poder Calorífico Inferior (cal.g^{-1})

W = Teor de Umidade do Material em base seca (%)

6 = fator de conversão referente à energia para evaporação da água de formação

3.9 Microscopia eletrônica de varredura

Esta análise foi desenvolvida no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, e analisadas por meio de elétron-micrografias de varredura. As amostras secas dos bagaços *in natura*, pré-tratados e o resíduo de hidrólise enzimática, foram

posicionadas de forma a possibilitar uma visualização perpendicular ao sentido das fibras. Foram fixadas com uma fita 55 de carbono junto aos stubs, estrutura cilíndrica metálica utilizada como suporte para as amostras (Figura 28A). 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 28B). 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 125/220). 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.

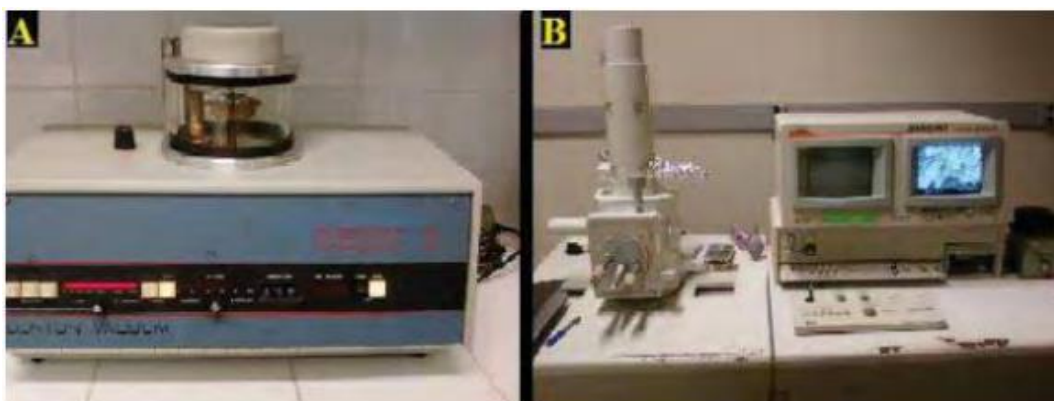


Figura 28. Metalização das amostras com ouro paládio através do equipamento DESK II - DENTON VACUM (A). Visualização microscópica das amostras através do equipamento JOEL- JSM5410 (B).

3.10 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância pelo teste F, e as médias obtidas comparadas pelo Teste de Tukey (5%), utilizando-se o programa Assistat.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química das biomassas *in natura*

O desenvolvimento de qualquer bioprocessamento requer prévio conhecimento da composição da matéria-prima. Isto porque quando se avalia o emprego das mesmas, torna-se óbvio que existem aspectos particulares que devem ser levados em consideração, por estarem relacionados à viabilidade técnica, aos balanços energéticos e à economicidade do bioprocessamento em desenvolvimento (PEREIRA JR., BOM e FERRARA 2008).

Na Tabela 04 encontram-se os resultados da composição química dos bagaços *in natura* de sorgo Sacarino, Forrageiro e Biomassa, comparados a resultados de outras pesquisas relatadas na literatura. Desta comparação pode-se constatar que os valores de celulose para o sorgo biomassa foram superiores aos obtidos por Barcelos (2012) trabalhando com sorgo sacarino e Batista (2016) para sorgo biomassa, e inferiores aos obtidos por Variz (2011) para sorgo forrageiro. Os teores de hemicelulose constatados foram menores que as demais referências, exceto para o sorgo sacarino avaliado por Barcelos (2012) que apresentou médias bem menores. Os teores de lignina determinada por Barcelos (2012) foram menores que 50% dos valores obtidos pelos demais trabalhos. Os teores de cinzas do sorgo biomassa observados nesta pesquisa foram similares aos forrageiros (VARIZ, 2011 e BATISTA, 2016) e também para o sacarino e biomassa obtidos por Batista (2016). Estas diferenças podem estar relacionadas à diferenças de comportamento entre genótipos, condições edafo-climáticas distintas, bem como às épocas de avaliação dos materiais e metodologia empregada na determinação.

A caracterização destes componentes químicos majoritários nas matérias-primas *in natura* é de fundamental importância para a compreensão dos efeitos do Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática que serão posteriormente realizados nos resíduos estudados.

Tabela 4. Composição química dos bagaços *in natura* de sorgo Forrageiro, Sacarino e Biomassa em comparação a resultados obtidos por outras pesquisas.

| Genótipos de Sorgo | Celulose (%) | Hemicelulose (%) | Lignina (%) | Cinzas (%) | Referências |
|---------------------------|---------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| Forrageiro | 34 | 20,75 | 17,66 | 0,91 | Este trabalho |
| Forrageiro | 39,5 a 44,1 | 24,7 a 27,6 | 22,3 a 23,2 | 5,5 a 5,9 | Variz, 2011 |
| Forrageiro | 24,46 a 19,13 | 34,61 a 37,37 | 6,11 a 5,79 | 6,49 a 6,97 | Batista, 2016 |
| Sacarino | 35,50 | 17,27 | 18,87 | 2,93 | Este trabalho |
| Sacarino | 21,26 | 11,62 | 10,31 | 0,55 | Barcelos, 2012 |
| Sacarino | 23,12 a 25,98 | 32,93 a 31,96 | 7,89 a 6,7 | 6,23 a 6,31 | Batista, 2016 |
| Biomassa | 37,72 | 20,55 | 24,37 | 6,73 | Este trabalho |
| Biomassa | 20,44 a 22,1 | 30,57 a 35,65 | 6,7 a 7,91 | 3,79 a 6,50 | Batista, 2016 |

4.2 Características morfológicas dos bagaços de sorgo

Através da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos bagaços de sorgo (Figuras 29 A e B, 30 A e B e 31 A e B) pode-se constatar que no material *in natura* os três genótipos apresentaram estrutura intacta das fibras, comprimento e diâmetro regulares e boa distribuição das fibras dentro da matriz.

Entretanto, diferenças bastante significativas foram observadas após o pré-tratamento (Figuras 29 C e D; 30 C e D e 31 C e D). Verificou-se um rompimento destas, além de maior porosidade, com perda da integridade compacta, provavelmente devido à retirada de boa parte da fração hemicelulósica.

Após a etapa de pré-tratamento com ácido diluído (Figuras 29 E e F, 30 E e F e 31 E e F) é possível observar grandes quantidades de fibras livres de flocos de medula (células do parênquima), mostrando que a etapa de pré-tratamento pode proporcionar uma melhor disponibilidade das fibras celulósicas para processos subsequentes, tais como a conversão enzimática da celulose em glicose, para o processo de obtenção de etanol celulósico.

Resultados semelhantes foram obtidos por Variz (2011), Barcelos (2012) e Batista (2016) trabalhando com sorgo forrageiro, sacarino e forrageiro, sacarino e biomassa, respectivamente.

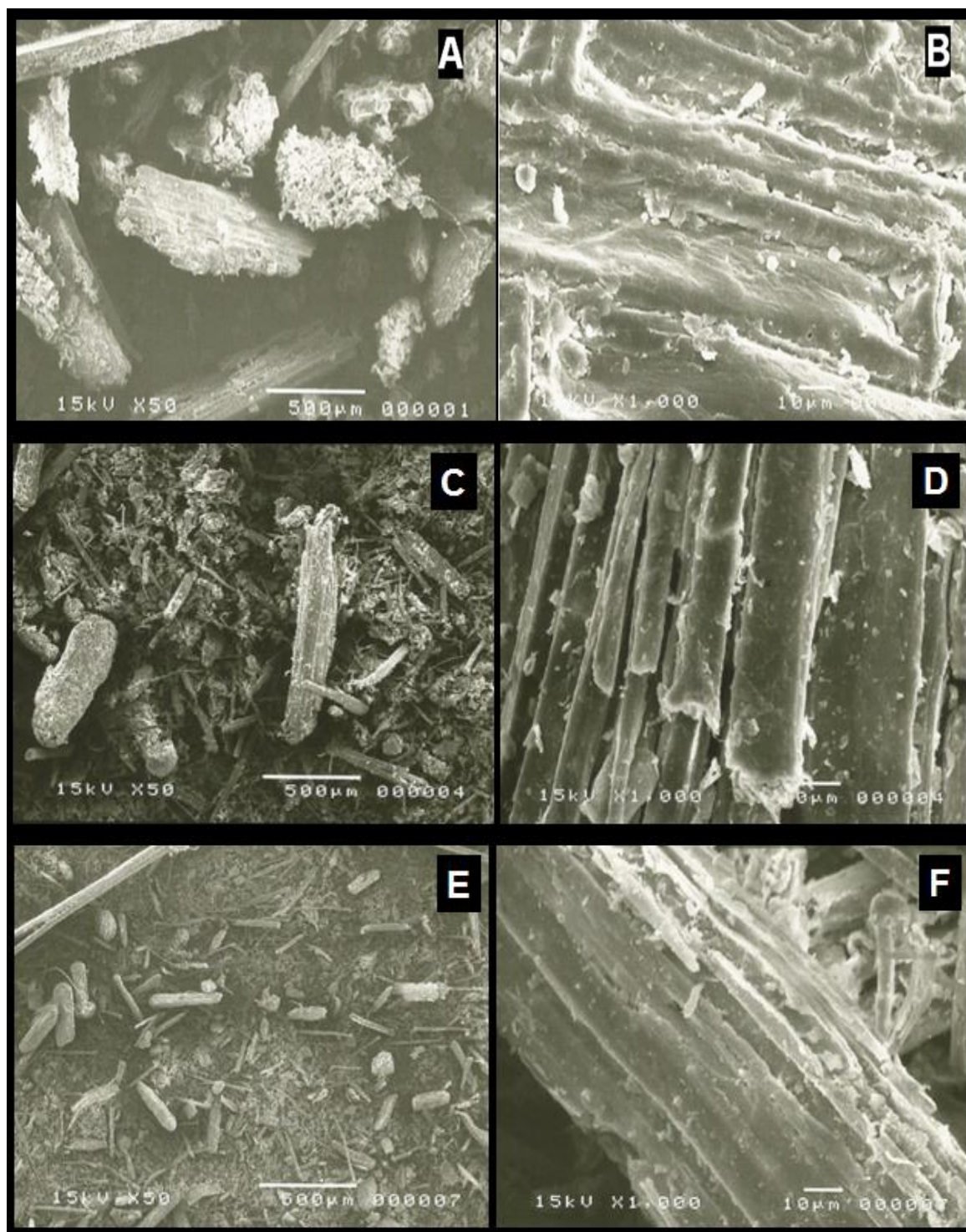


Figura 29. Fotomicrografias do bagaço de sorgo BRS508 “*in natura*” (A – aumento de 50x; B – aumento de 1000x); pré-tratado (C – aumento de 50x; D – aumento de 1000x) e após hidrólise enzimática (E – aumento de 50x; F – aumento de 1000x).

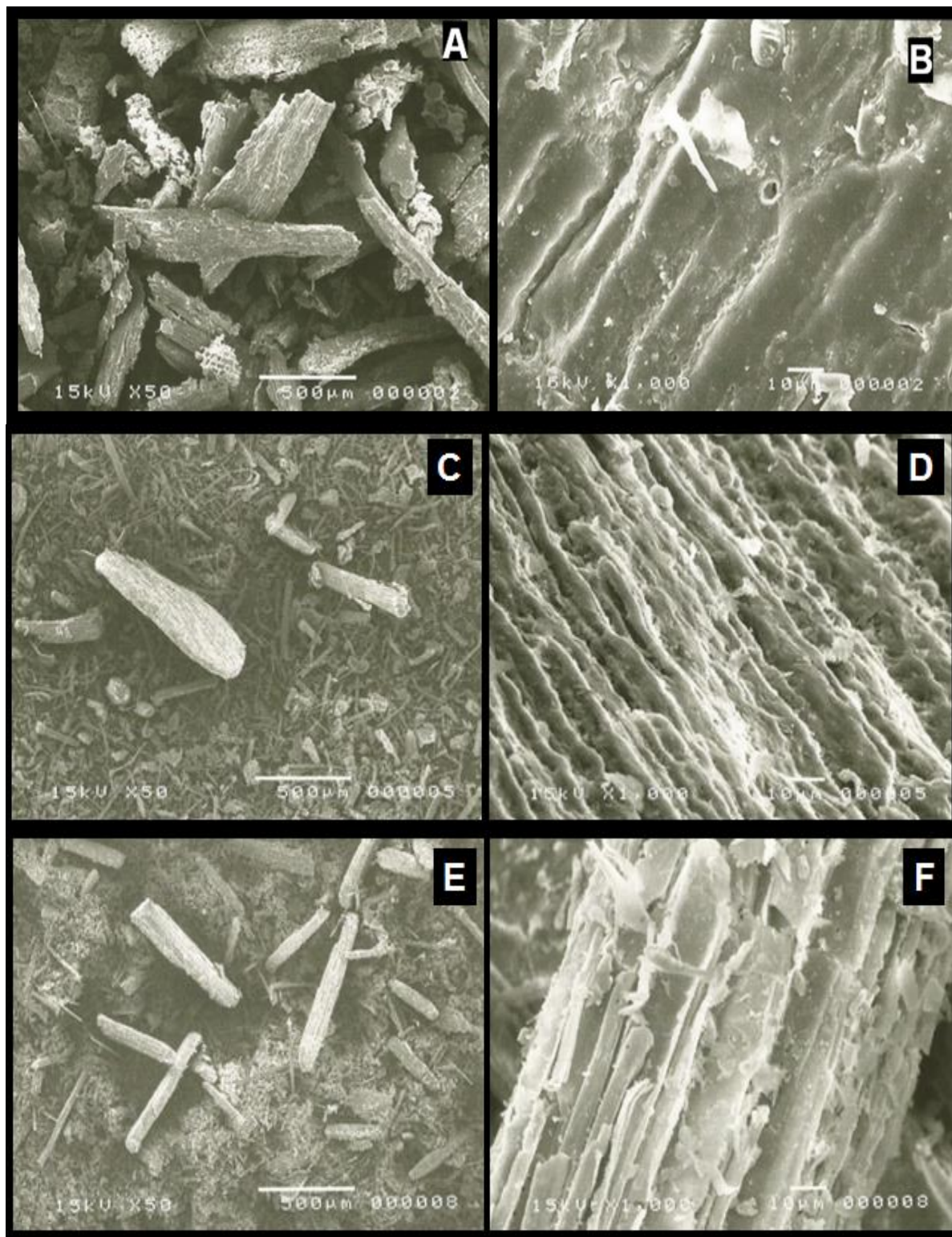


Figura 30. Fotomicrografias do bagaço de sorgo BRS610 *“in natura”* (A – aumento de 50x; B – aumento de 1000x); pré-tratado (C – aumento de 50x; D – aumento de 1000x) e após hidrólise enzimática (E – aumento de 50x; F – aumento de 1000x).

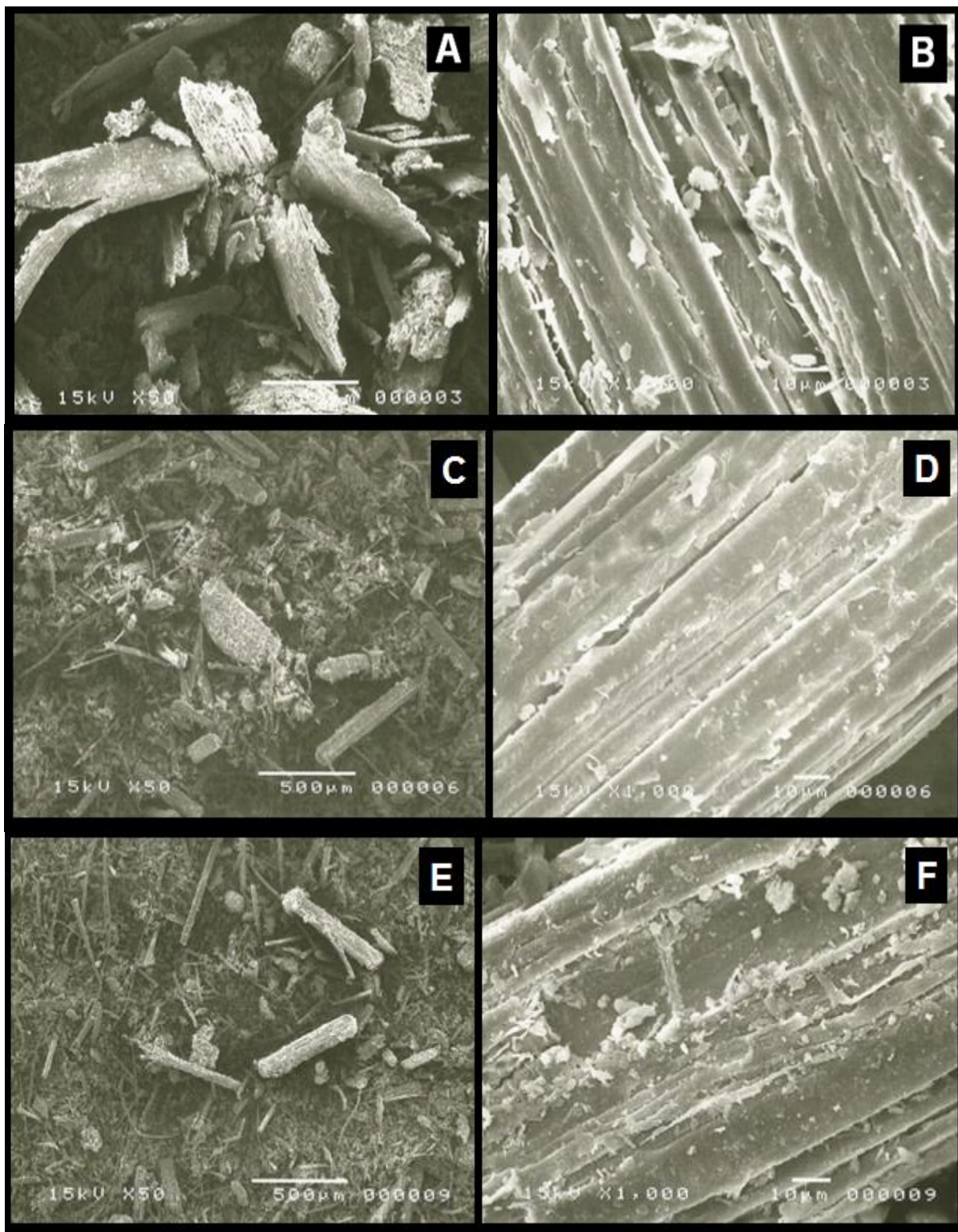


Figura 31. Fotomicrografias do bagaço de sorgo BD7605 “*in natura*” (A – aumento de 50x; B – aumento de 1000x); pré-tratado (C – aumento de 50x; D – aumento de 1000x) e após hidrólise enzimática (E – aumento de 50x; F – aumento de 1000x).

4.3 Screening das condições de pré-tratamento

As condições de pré-tratamento inicialmente ocorreram em reatores de escala de laboratório (CTBE), para adequar a melhor condição de pré-tratamento para as biomassas de sorgos.

Segundo Liao et al. (2007), o aumento da concentração de ácido favorece a solubilização da hemicelulose e o rendimento em xilose. No entanto, a força do ácido e os de interação com os fatores temperatura e tempo devem ser considerados. Neste sentido, o planejamento experimental do pré-tratamento ácido foi delineado para a obtenção de um hidrolisado com condições apropriadas para a subsequente fermentação, ou seja, com elevada concentração de açúcares e baixa concentração de inibidores.

A Tabela 05 apresenta o rendimento mássico de cada genótipo de sorgo obtido após cada uma das condições de teste de pré-tratamento.

Tabela 05. Rendimento mássico das biomassas dos genótipos de sorgo após os testes de pré-tratamento.

| Ensaio | Tempo (min.) | Temperatura (°C) | Conc. H ₂ SO ₄ (%, v/v) | Fração sólida recuperável (%) | | |
|--------|-----------------|---------------------|---|-------------------------------|--------|--------|
| | | | | BRS508 | BRS610 | BD7605 |
| 1 | 10 | 120 | 0,2 | 66,70 | 70,57 | 100,00 |
| 2 | 20 | 120 | 0,2 | 66,89 | 82,49 | 99,70 |
| 3 | 10 | 140 | 0,2 | 57,36 | 62,21 | 14,27 |
| 4 | 20 | 140 | 0,2 | 47,15 | 64,37 | 99,93 |
| 5 | 10 | 120 | 0,5 | 53,33 | 69,60 | 93,65 |
| 6 | 20 | 120 | 0,5 | 46,19 | 58,98 | 69,89 |
| 7 | 10 | 140 | 0,5 | 41,10 | 51,36 | 74,83 |
| 8 | 20 | 140 | 0,5 | 41,21 | 52,69 | 74,00 |
| 9 | 15 | 130 | 0,35 | 50,24 | 74,00 | 80,72 |
| 10 | 15 | 130 | 0,35 | 51,73 | 72,31 | 78,00 |
| 11 | 15 | 130 | 0,35 | 51,34 | 74,38 | 80,00 |

Nos ensaios 1 e 2, onde foram avaliadas as menores temperaturas, observou-se os maiores rendimentos mássicos para os três genótipos de sorgo, devido as condições mais brandas de pré-tratamento.

Barcelos (2012) estudando bagaço de sorgo sacarino com uma relação sólido/líquido 0,25 g/mL, concentração de 0,9 % v/v de ácido sulfúrico e tempo de exposição de 40 minutos, obteve um rendimento mássico de 66,2%, sendo que neste estudo, no ensaio 8 (140°C, 20 min e 0,5% (v/v) de ácido sulfúrico), o genótipo BD7605 apresentou um rendimento mássico de 74%, o BRS610 de 52,69% e o BRS508 de 41,21%.

A temperatura aumenta a severidade da hidrólise mais que o tempo, intensificando as velocidades das reações de despolimerização das hemiceluloses e as de formação de compostos inibidores, como, por exemplo, a despolimerização da lignina, as reações de desidratação da xilose a furfural e de formação de ácido acético, proveniente da ruptura das ligações dos radicais acetila com as cadeias de xilanas (CHUM et al., 1985).

As Figuras 32 e 33 apresentam as concentrações dos açúcares de cinco e seis carbonos, respectivamente, recuperados no licor hemicelulósico. Analisando as figuras é possível observar que nos ensaios de 1 a 4, onde a concentração de ácido é mais baixa, para ambos os genótipos de sorgo, ocorreu a menor solubilização dos açúcares.

As máximas recuperações dos açúcares de cinco carbono ocorreram no ensaio 8 (140°C, 20 min e 0,5% (v/v) de ácido sulfúrico), para ambos os genótipos, resultando em uma concentração de 17,95 g/L para o BRS508, 17,05 g/L para o BRS610 e 13,07 g/L para o BD7605.

É possível ainda observar que na maioria dos ensaios, o BRS508 apresentou maiores concentrações de açúcares, seguido pela BRS610 e BR7605. Isso mostra que os diferentes genótipos de sorgo apresentam características estruturais bastante distintas.

De acordo com Fengel e Wegener, (1989) e Pitarelo, (2007) o fato da hemicelulose apresentar grande polidispersidade, caráter relativamente amorfo e grau de polimerização bastante inferior ao da celulose nativa, a tornam muito mais susceptível à hidrólise durante o pré-tratamento ácido do que a fração celulósica.

Além disso, o pré-tratamento com ácido diluído tem a vantagem de não apenas solubilizar a hemicelulose, mas também de convertê-la em açúcares fermentáveis de baixa massa molecular (monômeros de xilose), o que elimina ou reduz a necessidade de se utilizar hemicelulases nos complexos enzimáticos durante a etapa de hidrólise enzimática (SAHA e BOTHAST, 1999; SAHA et al., 2005; BARCELOS, 2012).

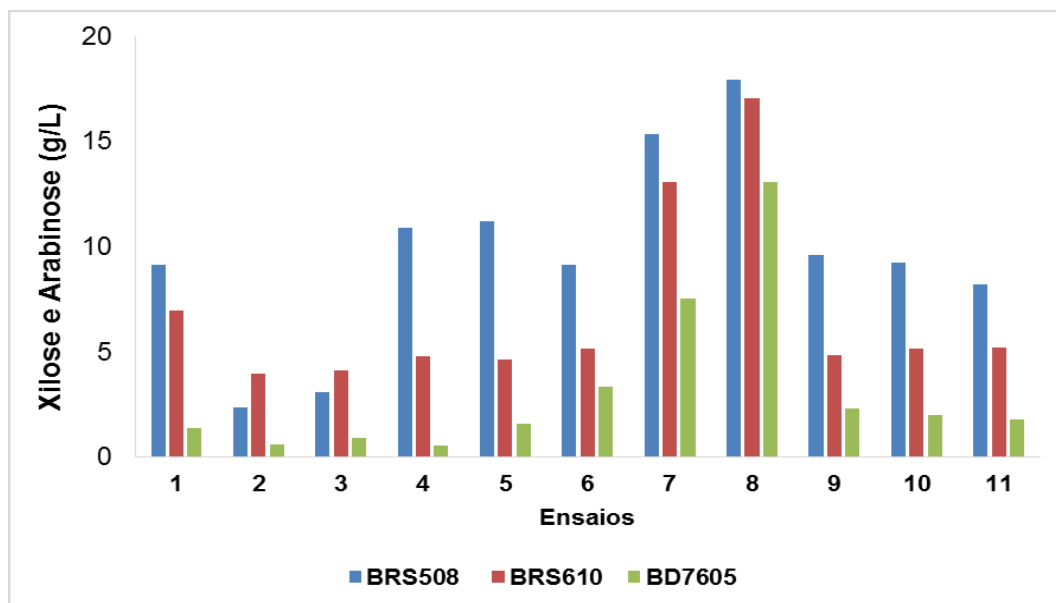


Figura 32. Concentração das médias dos açúcares de cinco carbono.

Analisando a Figura 33 é possível observar que nos ensaios 7 e 8 foram obtidas altas concentrações de açúcares de seis carbonos (glicose e celobiose). Isso se deve ao fato do pré-tratamento ser mais severo e solubilizar parcialmente a fração celulósica do material.

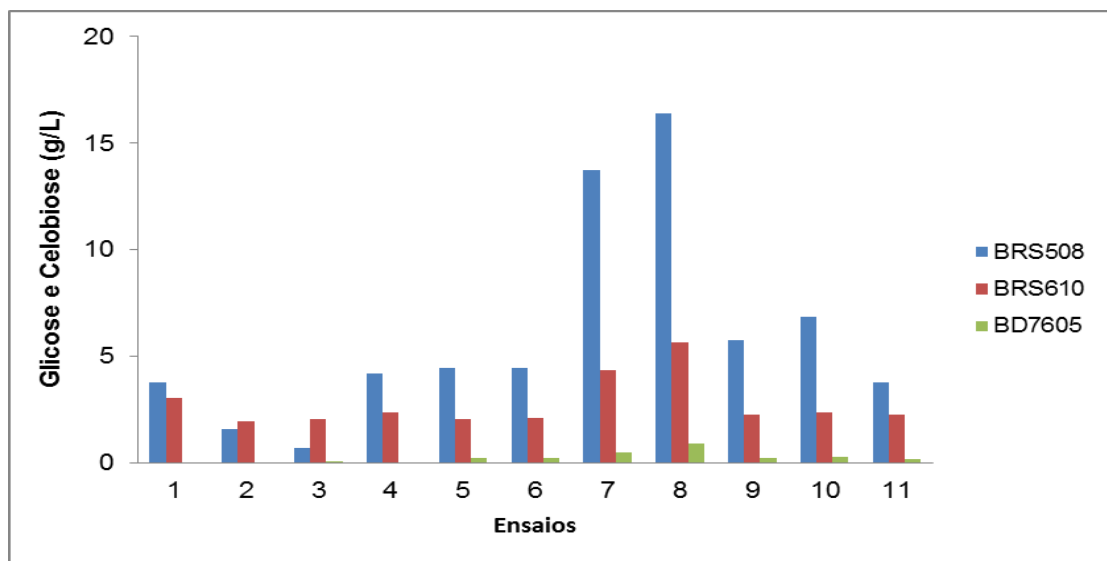


Figura 33. Concentração das médias dos açúcares de seis carbonos.

Nas condições mais severas de pré-tratamento verificou-se na Figura 34 o composto tóxico aos microrganismos como o ácido acético proveniente da quebra dos grupos acetil presentes na hemicelulose. No ensaio 8 (140°C, 20 min e 0,5% (v/v) de ácido sulfúrico) onde ocorreu a máxima recuperação dos açúcares de cinco carbono e 6 carbonos para ambos os genótipos, acarretou em uma maior concentração de ácido acético.

Os resultados da concentração de ácido fórmico não foram apresentados em figura por este apresentar valores mais elevados apenas nos ensaios 1 e 2, para o BRS508 e BRS610 na ordem de 2,61 g/L e 2,56 g/L, respectivamente. Nos demais ensaios de 3 a 11 não houve a presença desse inibidor.

Para os inibidores furfural e 5-hidroximetilfurfural observou-se do ensaio 1 a 11 concentrações de 0 a 0,01 g/L de ambos inibidores para todos os genótipos.

As baixas concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural encontradas indicam que as condições de pré-tratamento empregadas foram favoráveis para solubilizar os açúcares contidos na fração hemicelulósica dos bagaços de sorgo, sem causar a decomposição destes. Valores próximos de furfural (0,15 g/L), 5-hidroximetilfurfural (0,03 g/L) e ácido acético (2,60 g/L) foram encontrados por Carvalho (2004), trabalhando com condições de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar na qual utilizou temperatura (121°C) e tempo de reação (20 minutos).

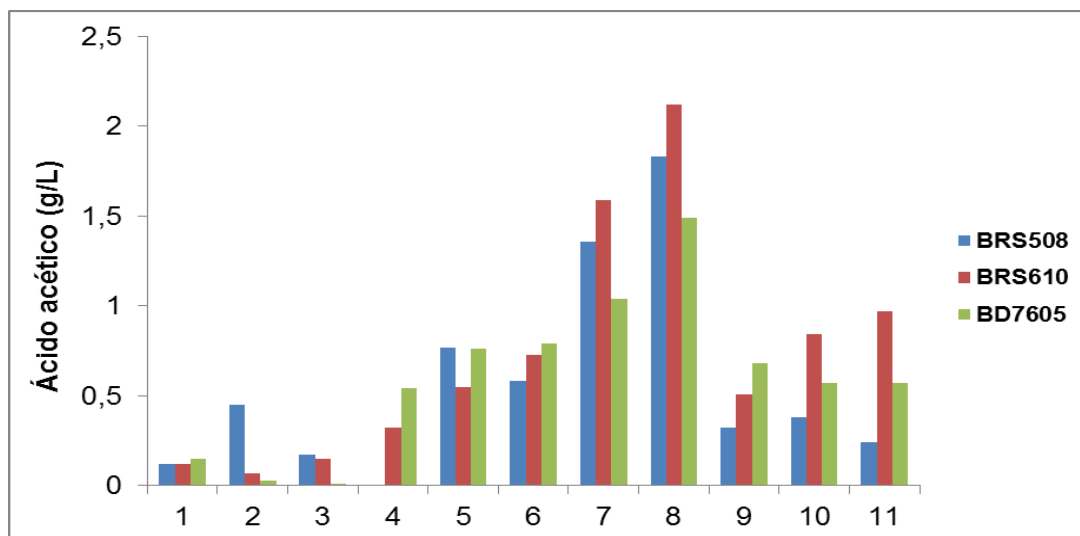


Figura 34. Concentração das médias de ácido acético.

De acordo com Silva (2011) altas temperaturas e curtos tempos de pré-tratamento favorecem o rendimento em xilose mais que temperaturas baixas e longos tempos, ou longos tempos e temperaturas altas, comportamento este notado neste estudo.

Entretanto, após os testes de pré-tratamento em escala de laboratório no CTBE, a melhor condição indicada nos testes foi o ensaio 8 para todos os genótipos de sorgo, porém esta teve que ser adaptada as condições em escala piloto no reator de 40 L da USP-Lorena.

O Scaling up do processo de pré-tratamento para posterior uso dos licores (fermentação C5) e utilização dos bagaços para hidrólise enzimática (fermentação C6) ocorreu nas condições descritas na tabela 6.

Tabela 6. Rendimento mássico das biomassas dos genótipos de sorgo após o Scaling de pré-tratamento.

| Tempo (min.) | Temperatura (°C) | Conc. H ₂ SO ₄ (% v/v) | Fração sólida recuperável (%) | | |
|--------------|------------------|--|-------------------------------|--------|--------|
| | | | BRS508 | BRS610 | BD7605 |
| 20 | 120 | 0,5 | 56,70 | 60,57 | 69,80 |

Após a realização do pré-tratamento na USP-Lorena, verifica-se significativa alteração na composição química dos bagaços. Analisando-se a Tabela 7 é possível observar que os extrativos no bagaço de sorgo variaram de 11 a 26%, valores menores que os relatados por Santos (2012), da ordem de 27% a 57%, estudando três variedades de sorgo sacarino, em diferentes épocas de colheita.

Tabela 7. Composição química dos bagaços de sorgo in natura e pré-tratado para os genótipos sacarino, forrageiro e biomassa.

| Composição química (%) | BRS508 (Sacarino) | | BRS610 (Forrageiro) | | BD7605 (Biomassa) | |
|------------------------|----------------------|---------|------------------------|---------|----------------------|---------|
| | Pré- | | Pré- | | Pré- | |
| | <i>In natura</i> | tratado | <i>In natura</i> | tratado | <i>In natura</i> | tratado |
| Extrativos | 22,30 | --- | 26,52 | --- | 11,83 | --- |
| Cinzas | 2,93 | 3,69 | 0,91 | 2,63 | 6,73 | 2,73 |
| Lignina total | 18,87 | 34,41 | 17,66 | 32,76 | 24,37 | 34,53 |
| Celulose | 35,50 | 45,95 | 34 | 57,34 | 37,72 | 48,24 |
| Hemicelulose | 17,27 | 9,19 | 20,75 | 9,3 | 20,55 | 9,71 |
| Total | 96,87 | 93,25 | 99,84 | 102,04 | 101,21 | 95,20 |

Para o teor de cinzas do bagaço de sorgo in natura, observou-se resultados elevados, especialmente para o genótipo BD7605 (biomassa), quando comparado aos valores observados por Oliveira et al. (2009) que obteve valor de 1,6% de cinzas no bagaço de sorgo não lavado. Relatos de Batista (2016) indicam teores mais elevados de cinzas para os genótipos forrageiro (6,7%) e sacarino (6,3%) e menores para a biomassa (5,1%) diferentemente do que foi observado neste estudo. Entretanto, sabe-se que o teor de cinzas está atrelado a condições de colheita do material, variando consideravelmente ao longo da safra. Além disso, varia em função do genótipo, idade e ambiente de produção.

O teor de lignina no bagaço do sorgo biomassa foi cerca de 30% maior do que nos demais genótipos que apresentaram valores similares. Entretanto quando se realizou o pré-tratamento, constatou-se que os teores de lignina foram bem superiores aos dos bagaços in natura apresentando valores similares. Isso se deve ao fato das hemiceluloses serem solubilizadas durante a etapa de pré-tratamento

ácido e, por isso, o teor de lignina aumenta em termos percentuais. Os resultados determinados neste estudo foram maiores que os relatados por Oliveira et al. (2009) de 16,54%. Batista (2016) encontrou valores ainda menores, da ordem de 7,3% para os genótipos sacarino e energia e 6,0% para o forrageiro.

A lignina é um dos componentes que não é passível de fermentação. Assim, espera-se que os genótipos que apresentarem menores teores de lignina nos colmos, provavelmente sejam mais susceptíveis ao pré-tratamento, resultando em maiores concentrações de açúcares para a produção de etanol de segunda geração.

Os resultados da composição química das biomassas pré-tratadas indicam que após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído houve redução na porcentagem de hemicelulose, e aumento proporcional de celulose. Valores médios na faixa de 32 a 46% de celulose e 20 a 28% de hemicelulose, também foram observados por (XU et al.; PANAGIOTOPOULOS et al.; YU et al.; SALVI et al.; KIM E DAY; ZHANG et al, 2010; LI et al., 2010, BELAYACHI E DEMAS, 1995; VÁSQUEZ et al., 2007; HERRERA et al., 2004).

As fotomicrografias confirmam os resultados obtidos para as análises químicas, as quais evidenciam uma grande solubilização dos componentes, tornando as fibras mais expostas a cada etapa de processamento da biomassa e com isso aumentando sua área superficial (OHGREN et al., 2007).

4.4 Identificação, caracterização e classificação da levedura

As colônias observadas no meio GYMP apresentavam características homogêneas quanto à cor (branca), tamanho da colônia (1 a 4 mm), textura brilhante, elevação convexa e bordo Liso (Figura 35).



Figura 35. Fotografia de colônias da levedura LJ3, em meio GYMP, após 72 horas de incubação, a 30°C. (Fonte: arquivo pessoal)

A avaliação do crescimento a estirpe LJ03 sob diferentes temperaturas indicaram que esta se desenvolveu nas três diferentes temperaturas estudadas (Tabela 8). Verificou-se que para as três condições ocorreu turvação do meio indicando que houve desdobramento do meio e crescimento da levedura. O estudo da análise de crescimento das estirpes é de extrema importância uma vez que a capacidade fermentativa, bem como sua eficiência na produção de etanol, é influenciada diretamente pela temperatura.

Tabela 8. Resultado apresentado pela estirpe LJ03 quando inoculada no meio de crescimento em diferentes temperaturas.

| Temperatura | | | |
|-------------|------|------|------|
| Levedura | 35°C | 37°C | 40°C |
| LJ03 | + | + | + |

Legenda: (+) crescimento intenso; (+W) crescimento moderado ou pouco; (-) sem crescimento.

Neste sentido, cabe destacar que o emprego de microrganismos termotolerantes como a LJ03, podem proporcionar a redução dos custos industriais para resfriamento do mosto, nos processos fermentativos, que normalmente se desenvolvem a 30-35°C.

Para avaliação da capacidade fermentativa observou-se que a estirpe LJ03 apresentou desempenho de assimilação semelhante para todas as fontes de carbono estudadas (Tabela 9). Embora tenha apresentado fraca fermentação para arabinose, é imprescindível destacar a capacidade de desdobrar tanto glicose e como a xilose (fermentação forte). Esta característica é de fundamental importância por possibilitar a utilização da mesma levedura para a realização de processos fermentativos a partir de matérias-primas que apresentam a mistura de hexoses e pentoses na composição do mosto, como o licor obtido do pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos.

Tabela 9. Resultado apresentado pela estirpe LJ03 quando inoculada no meio basal de fermentação nas diferentes fontes de carbono.

| Levedura | Glicose | Frutose | Sacarose | Rafinose | Xilose | Arabinose |
|----------|---------|---------|----------|----------|--------|-----------|
| LJ03 | + | + | + | + | + | +W |

Legenda: (+) Assimilação forte; (+S) Assimilação lenta; (+W) Assimilação fraca; (+VW) Assimilação muito fraca; (-) Assimilação negativa.

A extração de DNA e amplificação por PCR, utilizando par de primers ITS1 e ITS4, compreendendo toda a região ITS, resultou em fragmentos bem definidos e de tamanho esperado (500-750bp) para a amostra.

As bandas obtidas em gel de agarose foram cortadas e purificadas para reação de sequenciamento no equipamento ABI3500 Genetic Analyzer. As sequências geradas foram editadas para regiões de baixa qualidade (HQ). A comparação da sequência obtida contra a base de dados GenBank (NCBI) apresentou 100% de identidade, da espécie *Pichia kudriavzevii* (Tabela 10).

Uma avaliação do genoma com a comparação através dos bancos de dados internacionais como o NCBI revela a presença de genes que codificam enzimas envolvidas na utilização de xilose e a via pentose fosfato para a produção de etanol.

Tabela 10. Alinhamentos obtidos para a estirpe LJ03 comparada com a levedura *Pichia kudriavzevii* pertencente a Coleção de microrganismos CBS6520, utilizando pequena subunidade de RNA ribossomal do gene, sequencia parcial, Espaçador transcrito interno 1, 5.

```

Query 12  AAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGTGATTTAGT 71
          |
Sbjct 126 AAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGTGATTTAGT 185

Query 72  ACTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAACAACAACACCTAAAATGTGGAATATAGCATATAG 131
          |
Sbjct 186  ACTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAACAACAACACCTAAAATGTGGAATATAGCATATAG 245

Query 132 TCGACAAGAGAAATCTACGAAAAACAACAACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTC 191
          |
Sbjct 246  TCGACAAGAGAAATCTACGAAAAACAACAACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTC 305

Query 192  GCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATC 251
          |
Sbjct 306  GCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATC 365

Query 252  ATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCTCGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGC 311
          |
Sbjct 366  ATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCTCGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGC 425

Query 312  GTCGTTTCCATCTTGCGCGTGCGCAGAGTTGGGGGAGCGGAGCGGACGACGTGTAAAGAG 371
          |
Sbjct 426  GTCGTTTCCATCTTGCGCGTGCGCAGAGTTGGGGGAGCGGAGCGGACGACGTGTAAAGAG 485

Query 372  CGTCGGAGCTGCGACTCGCCTGAAAGGGAGCGAAGCTGGCCGAGCGAACTAGACTttttt 431
          |
Sbjct 486  CGTCGGAGCTGCGACTCGCCTGAAAGGGAGCGAAGCTGGCCGAGCGAACTAGACTTTTTT 545

Query 432  tCAGGGACGCTTGGCGGCCGAGAGCGAGTGTGCGAGACAACAAAAAGCTCGACCTCAAA 491
          |
Sbjct 546  TCAGGGACGCTTGGCGGCCGAGAGCGAGTGTGCGAGACAACAAAAAGCTCGACCTCAAA 605

Query 492  TCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA 539
          |
Sbjct 606  TCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA 653

```

Legenda: RNA gene de ribossomal 8S, e espaçador transcrito interno 2, sequência completa; e grande subunidade ribossomal RNA gene. comprimento da sequência parcial = 880. Pontuação = 976 bits (528), Expect = 0.0
 Identities = 528/528 (100%), Gaps = 0/528 (0%); Strand = Plus / Plus

4.5 Fermentação de pentoses

Para avaliar o potencial do sorgo sacarino, forrageiro e energia, como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração, um ensaio fermentativo da fração hemicelulósica do bagaço de sorgo, obtido após o pré-

tratamento ácido diluído na condição otimizada, foi realizado, empregando a linhagem LJ03 como agente fermentativo.

O consumo de xilose pela levedura LJ03 (Figura 36) apresentou comportamento diferente entre os genótipos estudados e o tratamento controle (meio sintético).

A comparação do metabolismo de xilose entre os genótipos indica que este foi maior para o BRS508 (sacarino) e BRS610 (forrageiro), sendo que para o BD7605 (biomassa) o consumo foi mais lento. Deve-se destacar que o consumo de xilose, não foi total, estabilizando-se a partir de 24 horas para o BRS508 e BRS610, e às 48 horas para o BD7605. Para o tratamento controle observou-se que a pentose foi consumida mais lentamente (Figura 36), sendo que este comportamento pode estar relacionado à não adição de nutrientes ao mosto após o pré-tratamento e destoxificação.

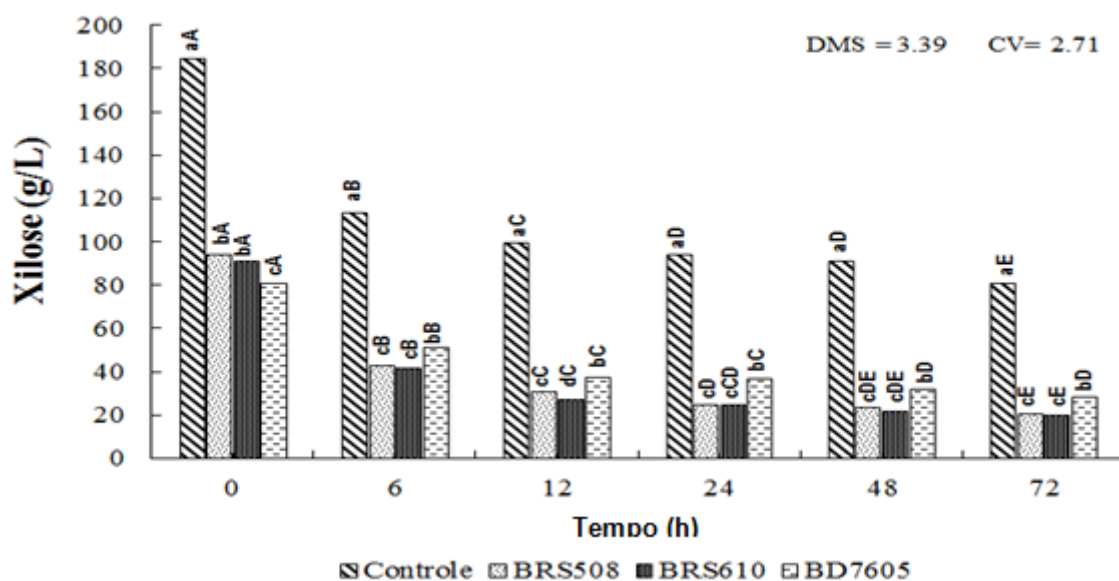


Figura 36. Desdobramento de xilose ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e biomassa (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo.

Para arabinose (Figura 37) observa-se que para os genótipos BD7605 e BRS610, houve esgotamento completo, em 48 e 72 horas de fermentação, respectivamente. A metabolização da pentose no tratamento controle foi de 0,93 g/L em 12 horas. Neste caso não houve esgotamento dos açúcares, que se estabilizaram a partir de 24 horas. O genótipo BRS508 apresentou a maior concentração de arabinose no início do processo fermentativo (10,20g/L), sendo o consumo mais lento, não se esgotando no final do processo (Figura 37).

O menor consumo de arabinose pela levedura tem sido relatado por outros pesquisadores quando da utilização de hidrolisados tanto de palha de sorgo (SENE et al. 2011), quanto de bagaço de cana-de-açúcar (FELIPE et al., 1997; RODRIGUES et al., 2003).

De acordo com Shi et al. (2000) a via de assimilação de arabinose por leveduras é bastante similar à da xilose.

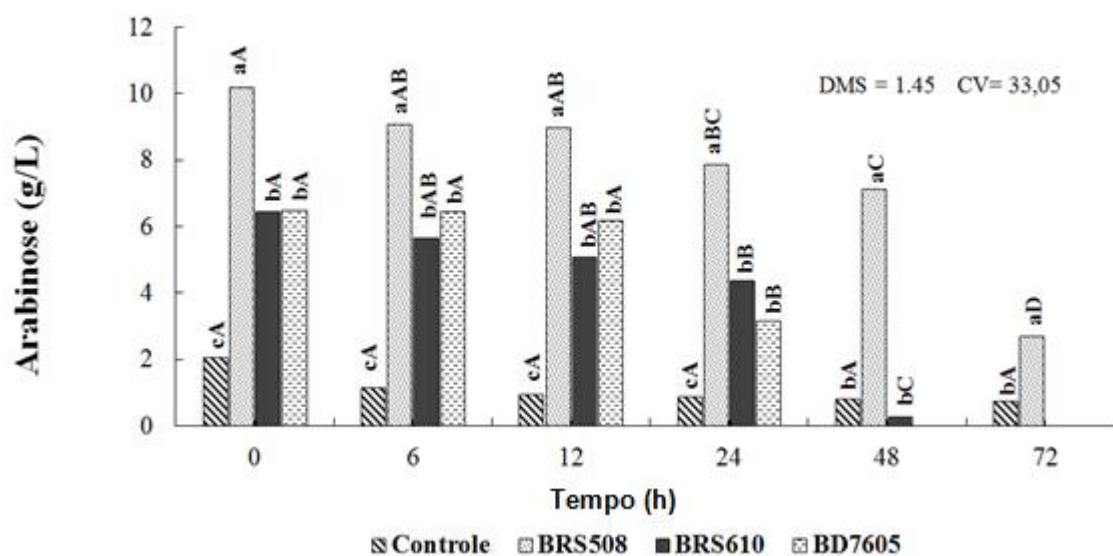


Figura 37. Desdobramento de arabinose ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e biomassa (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo.

Os resultados da metabolização de glicose (Figura 38) indicam que este açúcar foi rapidamente utilizado pela levedura, nas primeiras 6 horas de fermentação. Entretanto, não houve repressão no consumo de xilose, uma vez que, o consumo desta pentose ocorreu concomitantemente com o de glicose (Figura 36).

Antunes (1997) e Betancur (2010) relataram que o sistema de transporte para glicose é constitutivo e indutivo para xilose, podendo acarretar repressão do consumo de xilose na presença de glicose. Os resultados obtidos neste estudo não caracterizaram esta repressão conforme Figuras 36 e 38. Estudos realizados por Isono et al. (2012) confirmaram que a estirpe MF-121 de *P. kudriavzevii* apresentou habilidade para produzir etanol a partir de glicose, sob elevadas temperaturas e concentrações de sais e baixos valores de pH. Demonstraram ainda que esta estirpe produziu etanol a partir dos hidrolisados de amido e de materiais lignocelulósicos, confirmando que esta apresenta propriedades de tolerância a múltiplos estresses. Neste sentido verifica-se a potencialidade da sua utilização para a produção de etanol com baixos custos.

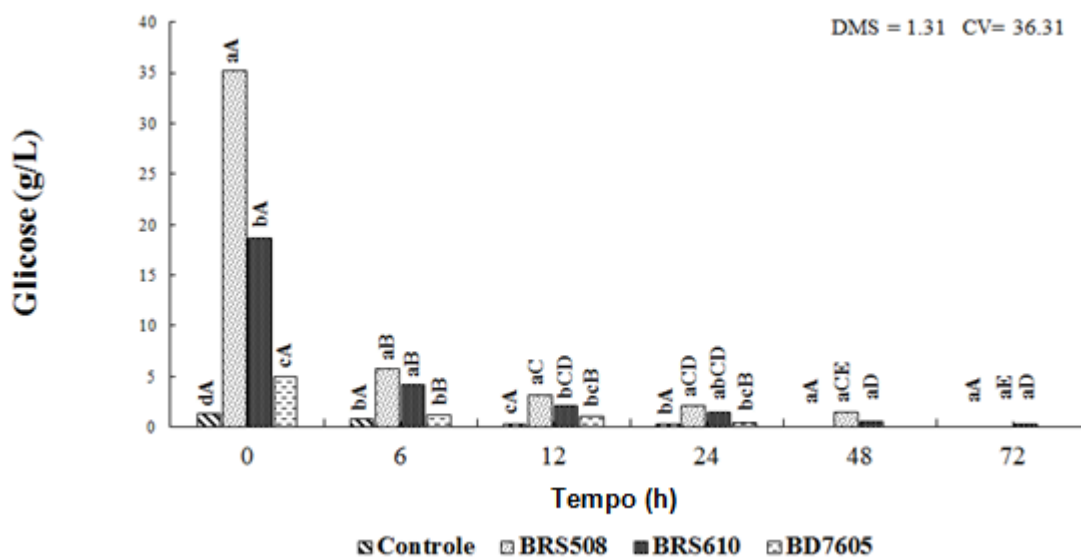


Figura 38. Desdobramento de glicose ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e biomassa (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo.

4.5.1 Viabilidade Celular

Durante o desenvolvimento do processo fermentativo, a viabilidade celular da *P. kudriavzevii* (LJ03) foi superior a 87%, com mais de 92% de brotos viáveis. (Figura 39). Verificou-se uma pequena redução da viabilidade das células a partir de 12 hs de fermentação, o que pode ter ocorrido em função do esgotamento do meio. Entretanto, para o genótipo BRS610 a viabilidade foi da ordem de 60% às 48 horas e de 50% às 72 horas, enquanto para os demais genótipos a viabilidade manteve-se superior a 60% até as 72 horas.

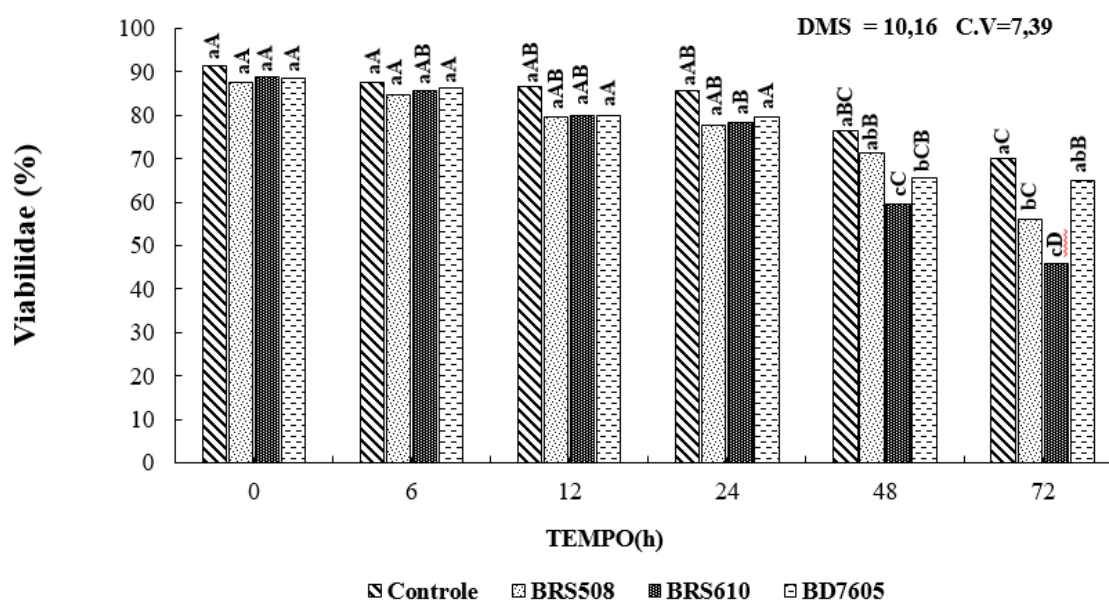


Figura 39. Viabilidade celular. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e biomassa (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo.

De acordo com Raveli (2010) a presença de biomoléculas inibidoras do processo fermentativo, tais como compostos fenólicos e ácidos, além de contaminantes pode provocar a queda na viabilidade das células ao longo dos ciclos fermentativos em função do estresse acumulado pela levedura. Neste caso, cabe

destacar que se utilizou a levedura *P. kudriavzevii* que é microrganismo descrito como robusto tendo como característica ser boa fermentadora de xilose, apresentando tolerância à presença de compostos inibidores produzidos por ocasião da hidrólise da biomassa lignocelulósica. Esta levedura apresenta tolerância multi-stress a pH baixo, altas concentrações de sais e temperaturas de até 42°C (ISONO et al., 2012). Neste caso acredita-se que a queda na viabilidade dos brotos (%) deve estar mais relacionada à esgotabilidade de aspectos nutricionais (Figura 40).

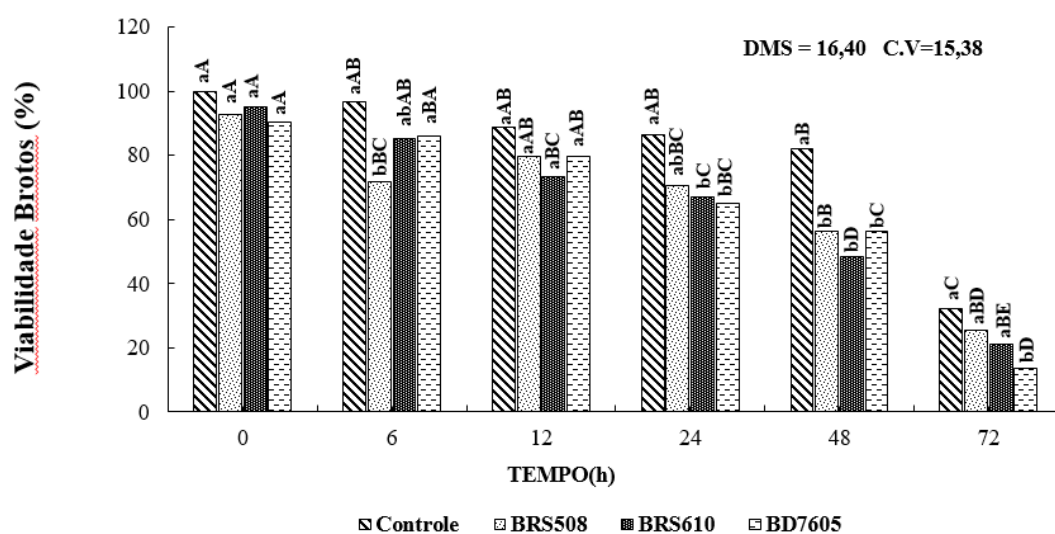


Figura 40. Viabilidade de brotos. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e biomassa (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo.

O índice de brotamento das leveduras permaneceu elevado durante todo o processo, não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 41). A alta porcentagem de brotamentos após 6 hs de fermentação pode ser justificada pela baixa concentração de açúcares no meio fermentativo. Segundo Walker (1998), devido ao Efeito Crabtree que algumas leveduras desenvolvem, em condições de baixa concentração de açúcares há o favorecimento do processo de respiração, favorecendo a multiplicação de células em taxas mais elevadas.

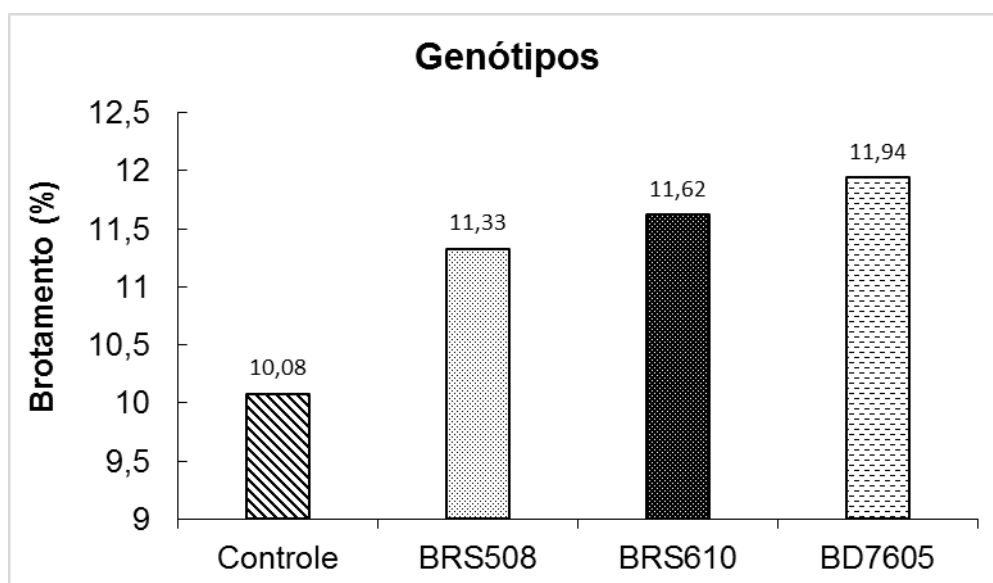


Figura 41. Índice de brotamento da levedura durante o período de 72 hs, em mosto sintético e pré-tratado de bagaço de sorgo.

4.5.2 Produção de Etanol e subprodutos

A produção de etanol foi crescente a partir de 6 horas de fermentação (Figura 42), com maior intensidade para o genótipo BRS508 e BRS610 que produziram 11,57g/L e 8,12g/L, com 12 horas de fermentação, respectivamente. Ao final de 72 horas obtiveram-se eficiência de 26,96% (BRS508, sacarino), 18,95% (BRS610, forrageiro) e 14,62% (BD7605, biomassa) de etanol. Para o tratamento controle houve produção de 3,17g/L de etanol em 72 horas, que pode ser considerada muito baixa. Este fato pode estar relacionado à carência na suplementação dos nutrientes de modo geral.

Cabe destacar ainda, que as condições experimentais sob as quais esta pesquisa foi desenvolvida podem não ter sido as melhores, considerando-se que esta levedura é termotolerante e que para neste caso padronizou-se a temperatura para a faixa de 32°C. Sabe-se que a temperatura é um dos fatores que podem afetar de modo direto a performance do processo fermentativo.

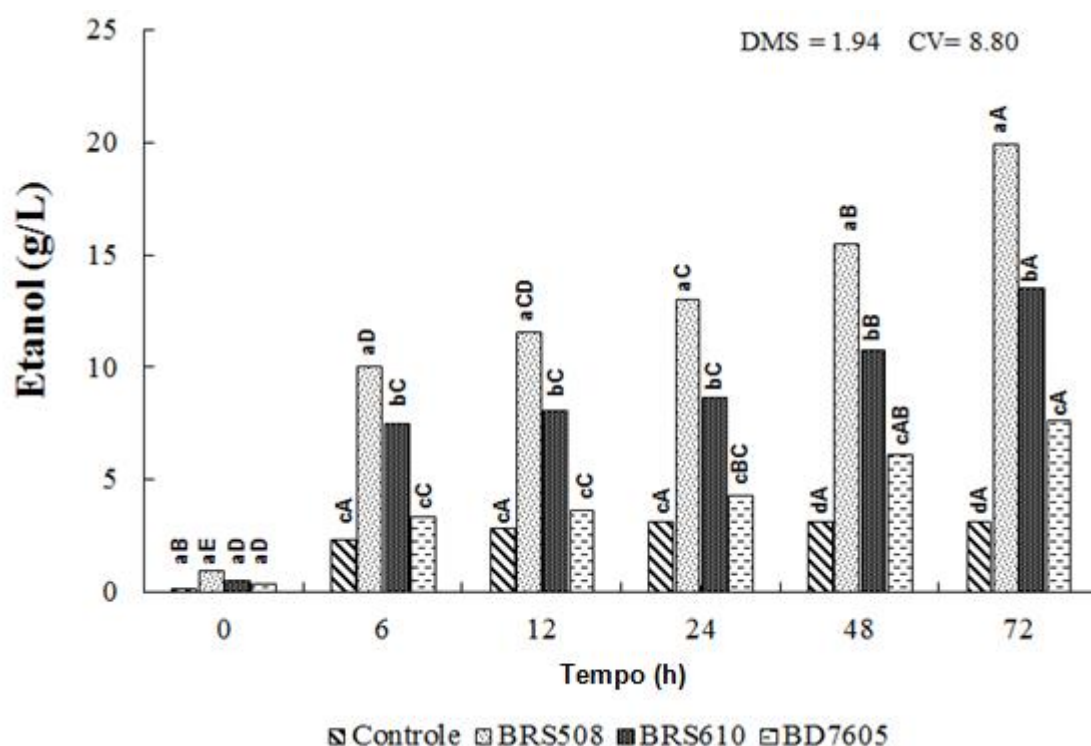


Figura 42. Produção de Etanol ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e biomassa (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo.

Relatos de Isono et al. (2012) avaliando 12 estirpes de *I. orientalis* comparando com *Saccharomyces cerevisiae*, em meio contendo glicose, sob condições de estresse (temperatura e sais) obtiveram produção similar para ambas leveduras, da ordem de 5% (v/v) de etanol. Dhaliwal, et al, (2011) obtiveram produção de etanol de 71,9 g.L⁻¹ por *P. kudriavzevii* a partir de 16,6 %de açúcar, sob temperatura de 40°C.

Os resultados obtidos neste estudo são bastante atrativos quando comparado aos reportados na literatura, pela confirmação do metabolismo xilulolítico da estirpe LJ03, apresentando habilidade para converter xilose a etanol. Deve-se considerar ainda que o custo de processamento do bagaço poderá ser menor pelo aproveitando de pentoses.

Durante o processo fermentativo houve também a produção de ácido acético (Figura 43), apresentando aumento progressivo para todos os tratamentos, sendo mais significativos após 24 horas de fermentação. Os valores mais elevados foram observados para o BD7605 (11,65g/L) após 48 e 72 horas.

O aumento da concentração de ácido acético (Figura 43) pode ter ocorrido pela utilização do etanol como substrato pelas leveduras (WALKER, 1998). Nesse caso, o etanol é convertido em acetaldeído e este em acetato; ou ainda diretamente em ácido acético pelo processo de oxidação. Neste sentido a formação de ácido acético não é desejável para este processo, pois o acúmulo deste pode levar a uma falta de energia para a manutenção do metabolismo da levedura. De acordo com Felipe et al (1997), o consumo de ATP pela ATPase para manter o gradiente de próton intracelular é prejudicado pelo declínio de pH que potencializa o efeito tóxico do ácido acético para a levedura *Candida guilliermondii*. Relatos de Felipe (1994) confirmaram a formação deste ácido em estudos com bagaço de cana-se-açúcar para a produção de xilitol, utilizando a mesma levedura.

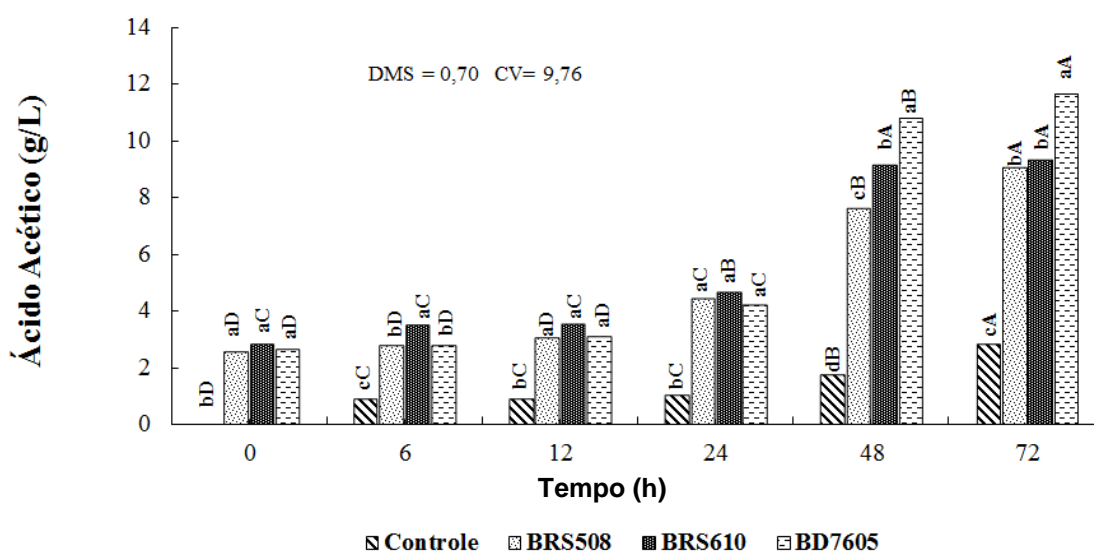


Figura 43. Produção de Ácido Acético ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e biomassa (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro

de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo.

Avaliando-se a produção de glicerol (Figura 44) verifica-se maior produção para o genótipo BRS508 (9,76g/L) após 72 horas de fermentação. Para o BRS610 e BD7605, obteve-se no mesmo tempo de fermentação, 5,7 a 3,72g/L respectivamente, enquanto para o tratamento controle obteve-se a menor concentração (2,94g/L). Durante o processo fermentativo pode-se observar o aumento da produção de glicerol (até 5g/L) em resposta ao aumento da concentração de etanol.

De acordo com Taherzadeh e Karimi (2011), a produção de glicerol é uma resposta metabólica das células do microrganismo às elevadas concentrações de etanol, tendo função protetora às células contra o estresse hídrico e rompimento de ligações de hidrogênio proporcionado pelo etanol. Neste sentido pode-se verificar que este comportamento foi confirmado quando se determinou a viabilidade das células, os brotamentos e a viabilidade dos brotos formados, que se apresentaram em níveis considerados elevados. Este fato é importante uma vez que possibilita o melhor desenvolvimento e manutenção da fisiologia da levedura em substrato com a presença de inibidores. Neste sentido pode-se observar que as maiores produções ocorreram exatamente ao final do processo fermentativo, quando maiores concentrações de ácidos, furfural e hidroximetilfurfural foram determinados.

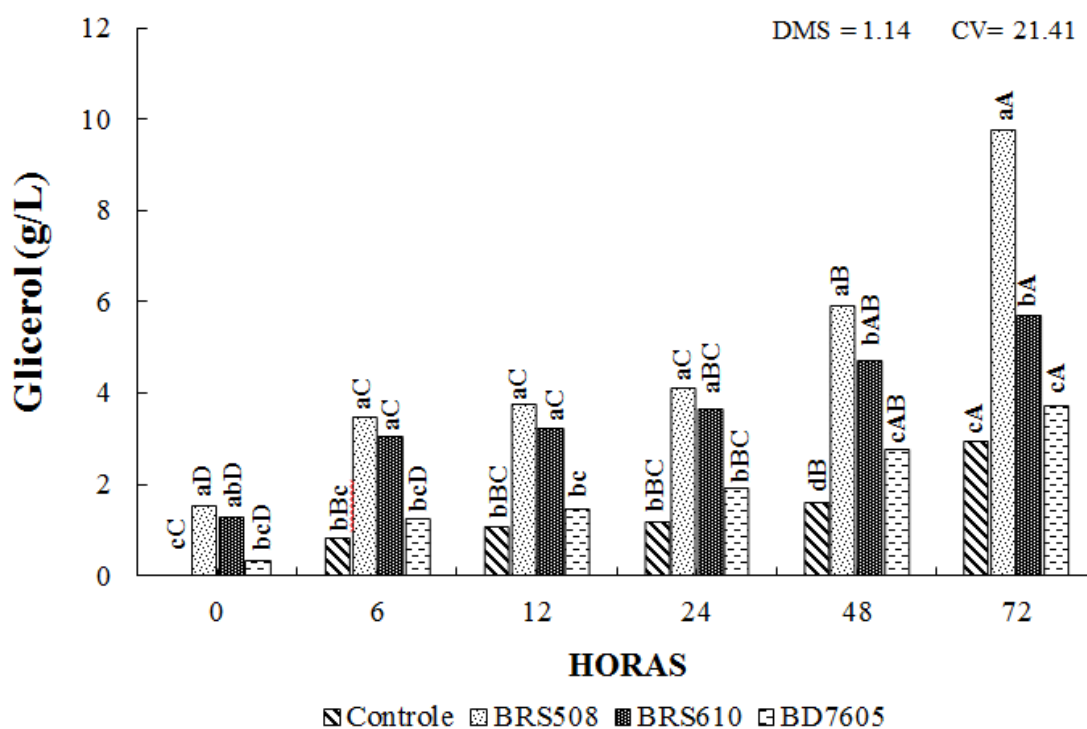


Figura 44. Produção de Glicerol ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e biomassa (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo.

4.6 Hidrólise enzimática

Concluído o pré-tratamento da biomassa, as hemiceluloses presentes no material são convertidas em açúcares, dentre eles as pentoses, com predominância da xilose. Após a separação do licor o resíduo de celulignina segue para a etapa de hidrólise enzimática para que ocorra a quebra das cadeias de celulose em açúcares fermentescíveis, as hexoses.

Os resultados obtidos para a composição química dos bagaços de sorgo submetidos à hidrólise enzimática estão apresentados na Tabela 11, de modo comparativo ao bagaço *in natura* e submetido ao pré-tratamento. Da sua análise verifica-se que houve aumento dos teores de celulose quando se compara o bagaço *in natura* com o produto obtido da hidrólise enzimática, confirmando que este

procedimento apresentou efeito positivo e significativo, considerando-se o propósito de se recuperar os açúcares contidos no bagaço como matéria-prima para a composição do mosto a ser fermentado.

Tabela 11. Composição química dos bagaços de sorgo in natura, pré-tratado e resíduo de hidrólise.

| GENÓTIPOS | | | | | | | | | |
|------------------------|-------------------|-------------|-------------------|---------------------|-------------|-------------------|-------------------|-------------|-------------------|
| Composição química (%) | BRS508 (sacarino) | | | BRS610 (forrageiro) | | | BD7605 (Biomassa) | | |
| | <i>In natura</i> | Pré-tratado | Resíduo hidrólise | <i>In natura</i> | Pré-tratado | Resíduo hidrólise | <i>In natura</i> | Pré-tratado | Resíduo hidrólise |
| Extrativos | 22,30 | --- | --- | 26,52 | --- | --- | 11,83 | --- | --- |
| Cinzas | 2,93 | 3,69 | 5,29 | 0,91 | 2,63 | 2,37 | 6,73 | 2,73 | 1,69 |
| Lignina total | 18,87 | 34,41 | 41,02 | 17,66 | 32,76 | 38,56 | 24,37 | 34,53 | 43,01 |
| Celulose | 35,50 | 45,95 | 42,02 | 34 | 57,34 | 51,95 | 37,72 | 48,24 | 47,3 |
| Hemicelulose | 17,27 | 9,19 | 9,12 | 20,75 | 9,3 | 9,72 | 20,55 | 9,71 | 8,03 |
| Total | 96,87 | 93,25 | 97,45 | 99,84 | 102,04 | 102,61 | 101,21 | 95,20 | 100,02 |

De acordo com Rabelo (2010) as condições do processo: temperatura, pH, tempo de sacarificação, concentração enzimática e relação sólido-líquido, dependem do substrato escolhido e das características do complexo enzimático utilizado, que devem ser determinadas e otimizadas experimentalmente para cada caso.

Diversas características da biomassa são consideradas importantes para efetuar a hidrólise enzimática, tais como: quantidade de lignina, presença de grupos acetil, cristalinidade da celulose, grau de polimerização, volume da área superficial/poros da fibra de celulose, e tamanho de partícula (SEWALT et al., 1997).

4.6.1 Atividade enzimática

Neste estudo, utilizou-se a enzima celluclast[®] 1.5L (Novozymes) 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.

Desta forma, traçou-se uma reta onde foi relacionada a concentração da enzima em cada uma das diluições em função da massa de glicose liberada por 1,0 mL dessa enzima diluída, determinando então a atividade enzimática da celluclast® 1.5L (Figura 45), como mostra a Equação abaixo:

$$\text{CBU/mL} = \frac{0,5}{(0,1816 \cdot 1,0 \cdot 30 \cdot [\text{enzima diluída}])} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$\text{CBU/mL} = \frac{0,0926}{[\text{enzima diluída}]}$$

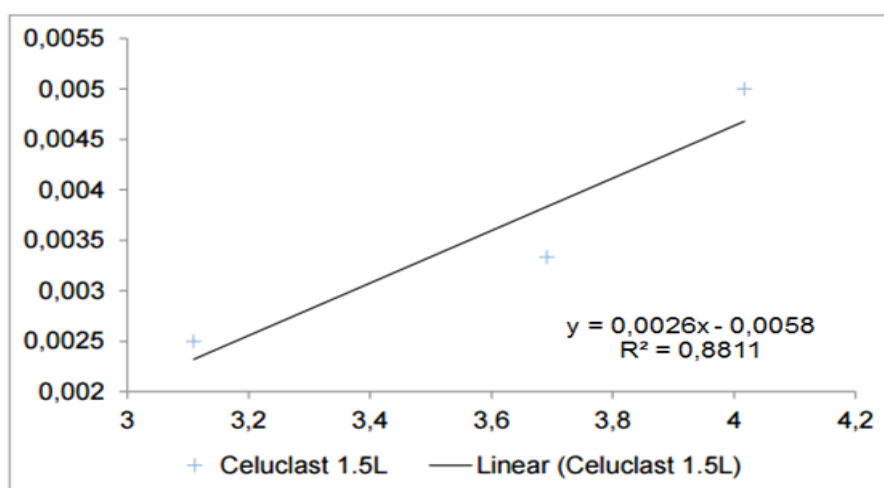


Figura 45. Representação gráfica da atividade da enzima celuclast 1.5L.

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

A atividade da enzima foi de 80,43 FPU, resultando na conversão de celulose de 37,25% para o genótipo BRS508, 35,45% para o BRS610 e 25,75% para o BD7605. Bussamra (2014) estudando o melhoramento de coquetéis enzimáticos para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, utilizou a enzima Celluclast 1.5 L (Novozymes) deparou com uma atividade dessa enzima de 108 FPU/mL, obtendo uma conversão de celulose de 49,11%, valor este superior ao deste estudo.

4.6.2 Perfil de Hidrólise Enzimática

O perfil da hidrólise enzimática para os genótipos BRS508 (sacarino), BRS610 (forrageiro) e BD7605 (biomassa) é apresentado nas Figuras 46, 47 e 48. O perfil mostra que nas primeiras horas do processo de hidrólise, ou seja, na fase de liquefação, há uma liberação rápida dos açúcares, aumentando gradativamente ao longo do tempo, não chegando a atingir um patamar.

Como pode ser observado nas Figuras 46, 47 e 48 a partir de 24 h, as concentrações de celobiose e xilose praticamente se mantiveram constantes, na hidrólise dos bagaços, enquanto a concentração de glicose foi aumentando para todos os genótipos.

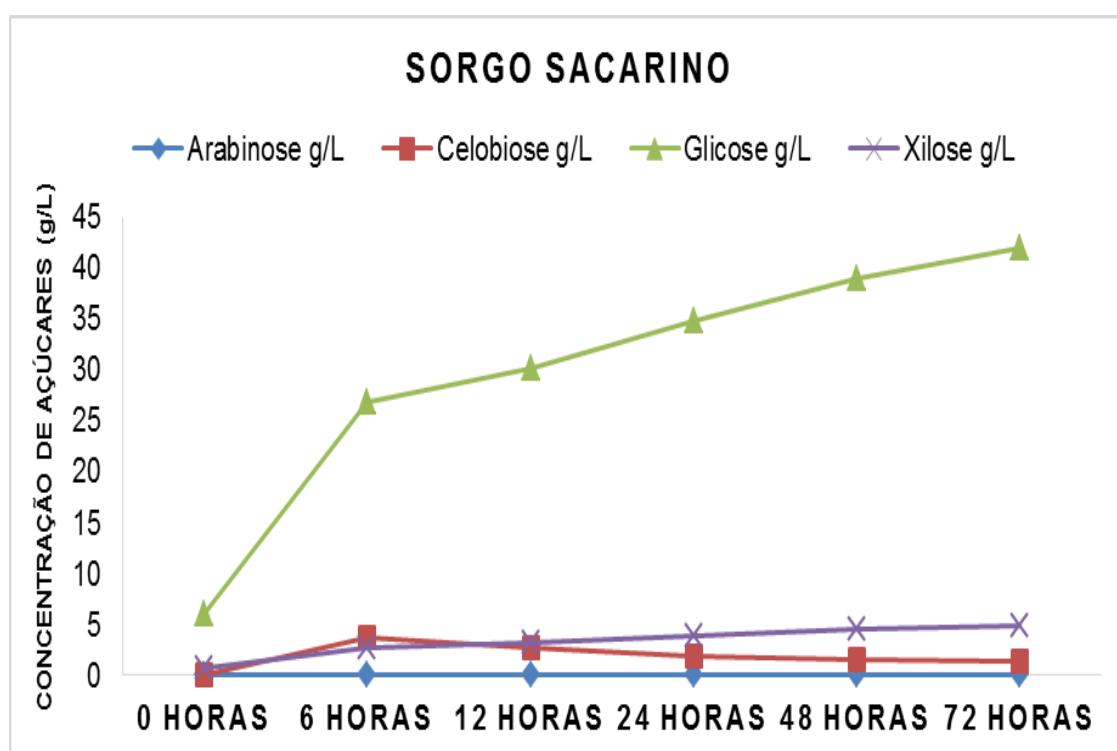


Figura 46. Perfil da hidrólise enzimática genótipo BRS508.

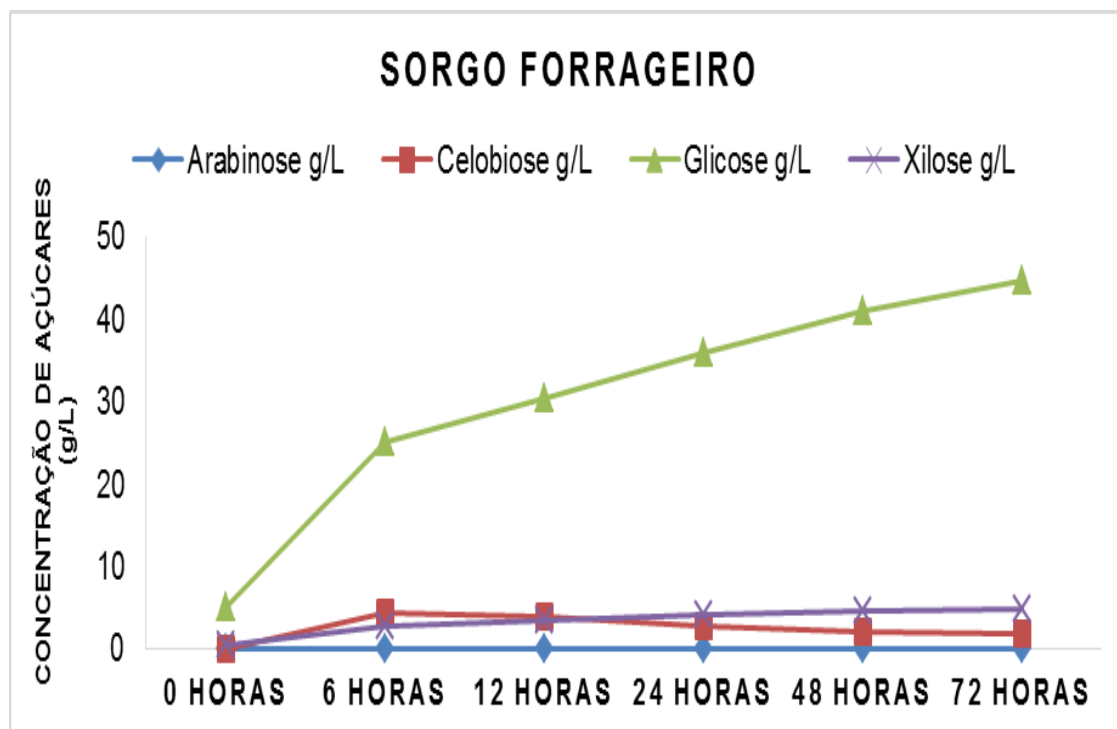


Figura 47. Perfil da hidrolise enzimática genótipo BRS610.

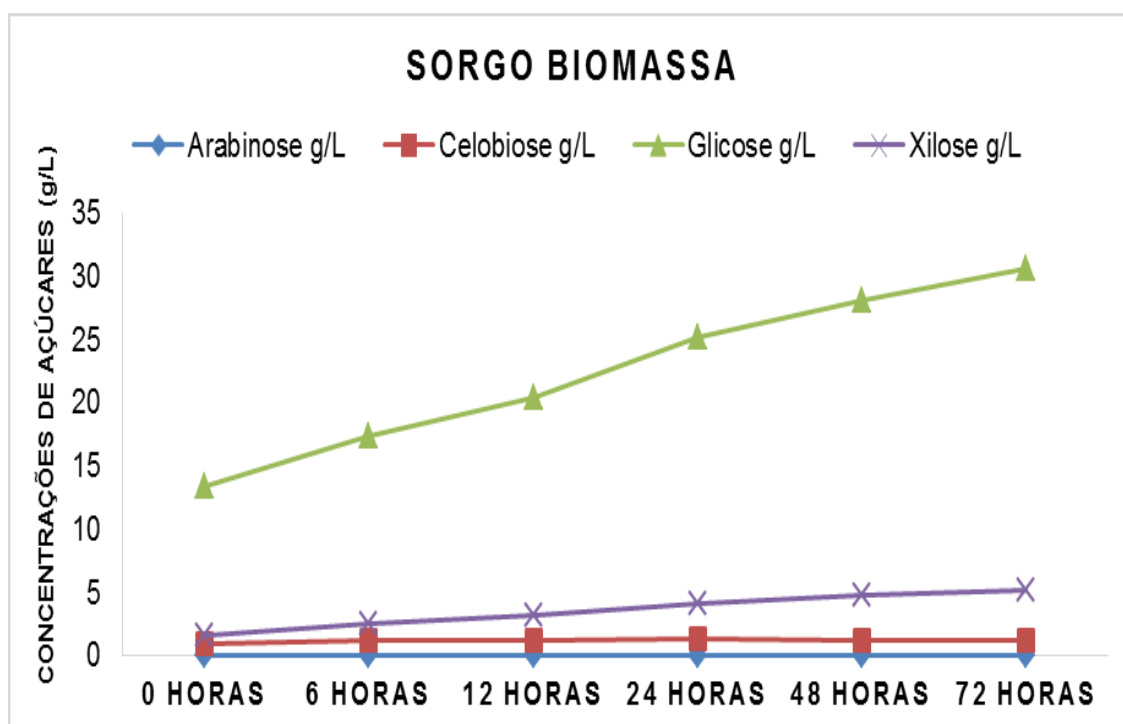


Figura 48. Perfil da hidrolise enzimática genótipo BD7605.

Ao final do processo (72 horas), o desempenho da enzima obteve uma concentração de glicose para BRS508, BRS610 e BD7605 de 41,94g/L; 44,75 g/L e 30,57 g/L, respectivamente.

4.7 Fermentação hidrolisado enzimático

Para melhor compreensão dos fatos ocorridos durante a realização dos ensaios, objetivando avaliar a ação da hidrólise enzimática em bagaço de sorgo é importante considerar a via metabólica de utilização de açúcares por leveduras para a produção de etanol

A análise da Figura 49 demonstra que o teor de glicose disponível nos mostos preparados a partir da hidrólise do bagaço de sorgo foi semelhante para os 3 genótipos estudados (tempo zero). Após a inoculação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) verifica-se que o consumo de glicose ocorreu de modo imediato e contínuo até 24 horas. Para o mosto dos genótipos BRS508 e BRS610 o consumo foi praticamente total, confirmando que esta levedura assimila preferencialmente esta fonte de carbono. Quando se utilizou o genótipo BD7605 observou-se que cerca de 50g/L de glicose não foram metabolizadas, sendo quantificados como açúcares residuais.

As possíveis razões para a menor velocidade de degradação dos carboidratos pode ser resultante da presença de inibidores originados nas etapas de pré-tratamento e hidrólise do material lignocelulósico, uma vez que a PE-2 apresenta tolerância a condições de estresse térmico, ácido e osmótico. Outro fato que pode ter contribuído para esta situação é decorrente da não disponibilidade de nutrientes em níveis adequados para que a levedura pudesse realizar as atividades metabólicas, comprometendo de certa maneira a eficiência e o rendimento do processo fermentativo.

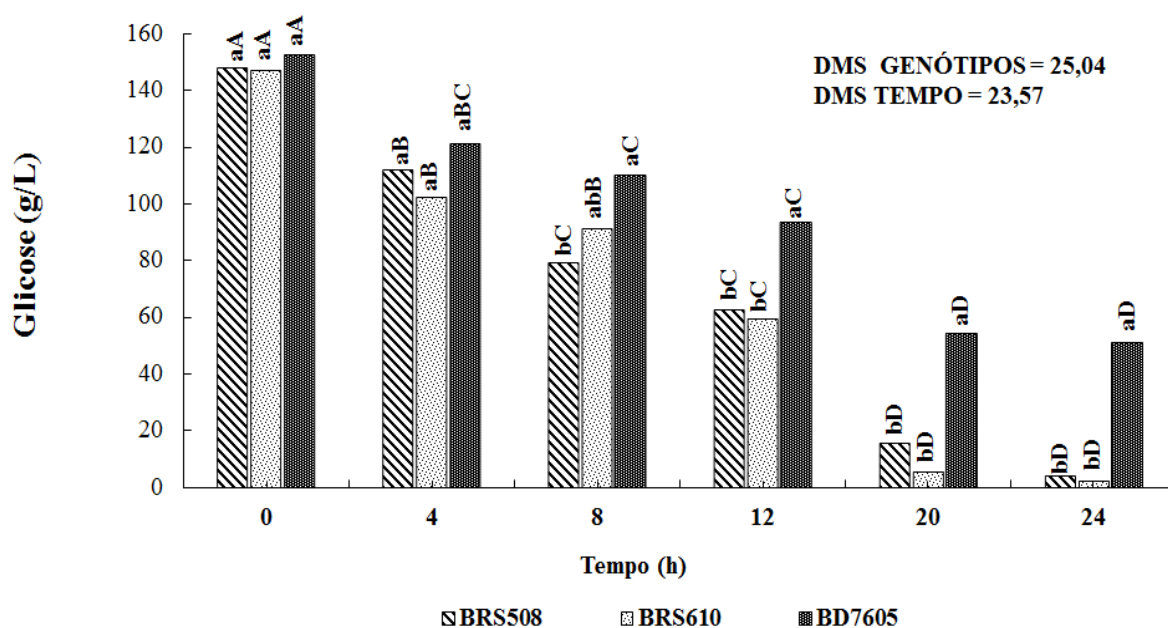


Figura 49. Desdobramento de glicose ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e biomassa (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo.

A celobiose é um dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose resultante da hidrólise incompleta da celulose. Avaliando-se o perfil de degradação de celobiose durante o processo fermentativo pela levedura PE-2 (Figura 50), verifica-se que os teores apresentados diferem entre os genótipos estudados, apresentando maiores concentrações para o forrageiro e o biomassa. Esta fonte de carbono apresentou uma degradação lenta, sendo totalmente consumido até 24 horas para mostos preparados a partir de sorgo biomassa e sacarino.

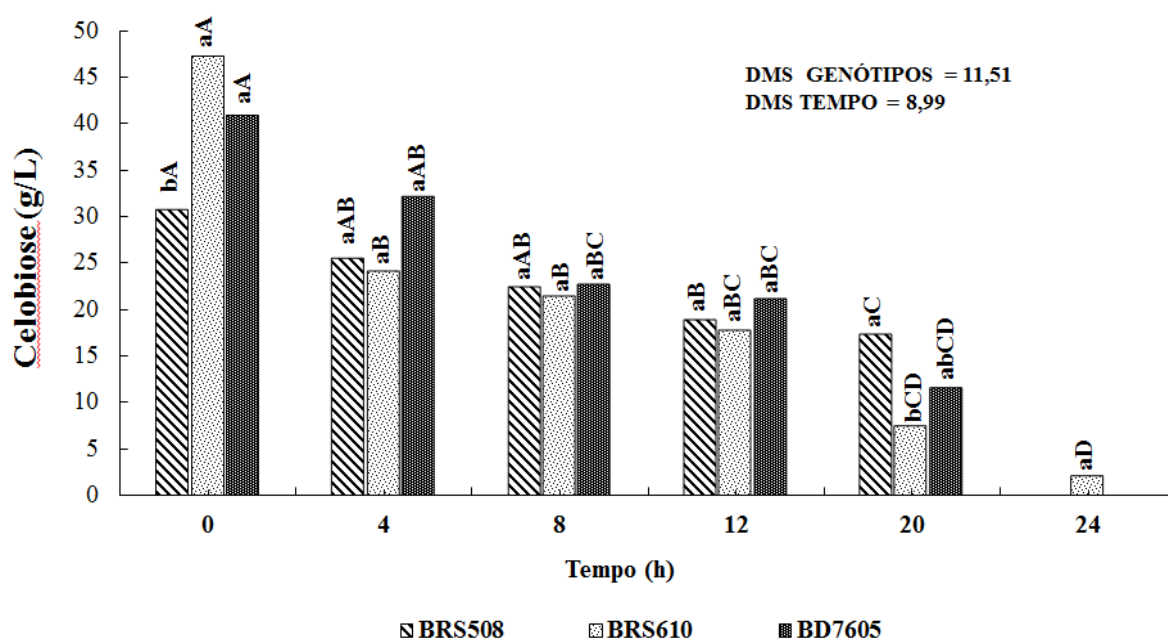


Figura 50. Desdobramento de celobiose ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e biomassa (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo.

Avaliando-se o perfil de desdobramento da arabinose durante a fermentação (Figura 51), verifica-se que as concentrações apresentadas para os diferentes genótipos variaram de 0,4 a 1,3 g/L, para o tempo zero. Entretanto não se observou um comportamento característico, com variações significativas entre os tempos analisados e os genótipos estudados. Após 12 horas de processo observou-se um incremento para o sacarino e o forrageiro, sendo que até 8 horas de fermentação o biomassa desdobrou todo açúcar.

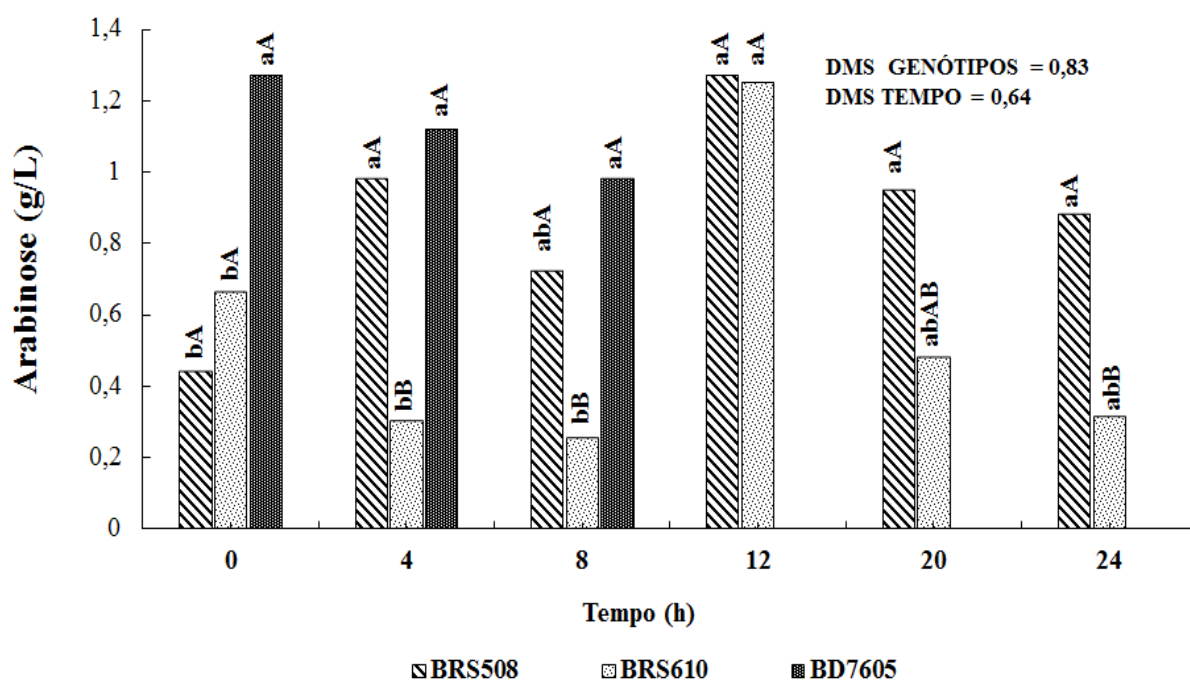


Figura 51. Desdobramento de arabinose ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e biomassa (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo.

O consumo de xilose (Figura 52 e 53) tanto entre os genótipos, como entre o tempo do processo fermentativo, manteve-se estável para todos os genótipos, não sendo consumida totalmente. Isso ocorre, pois a levedura PE-2 não apresenta habilidade para desdobrar essa pentose.

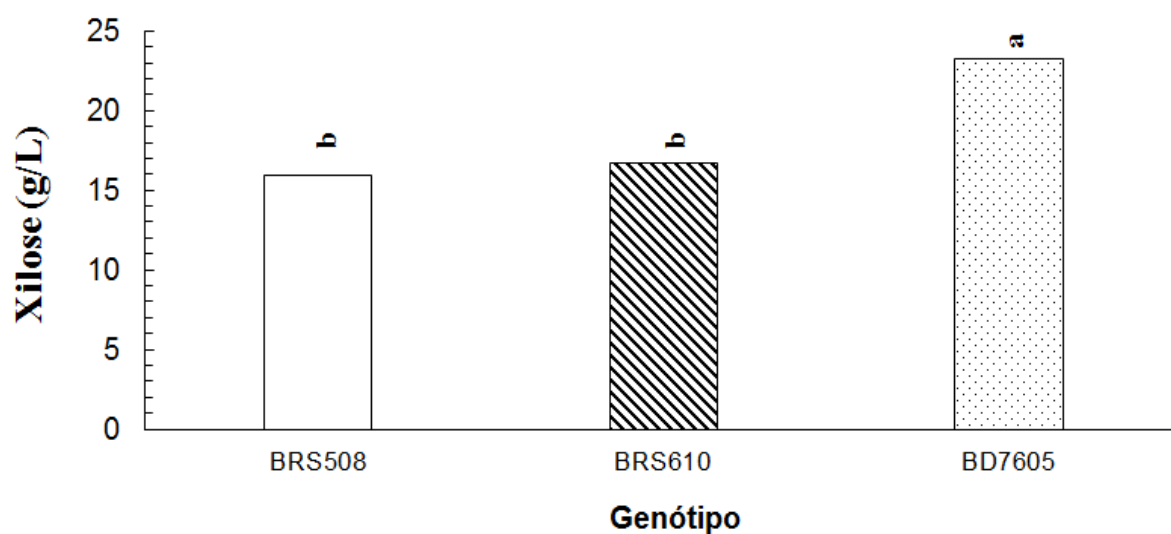


Figura 52. Comparação entre os genótipos do consumo de xilose pela levedura PE-2.

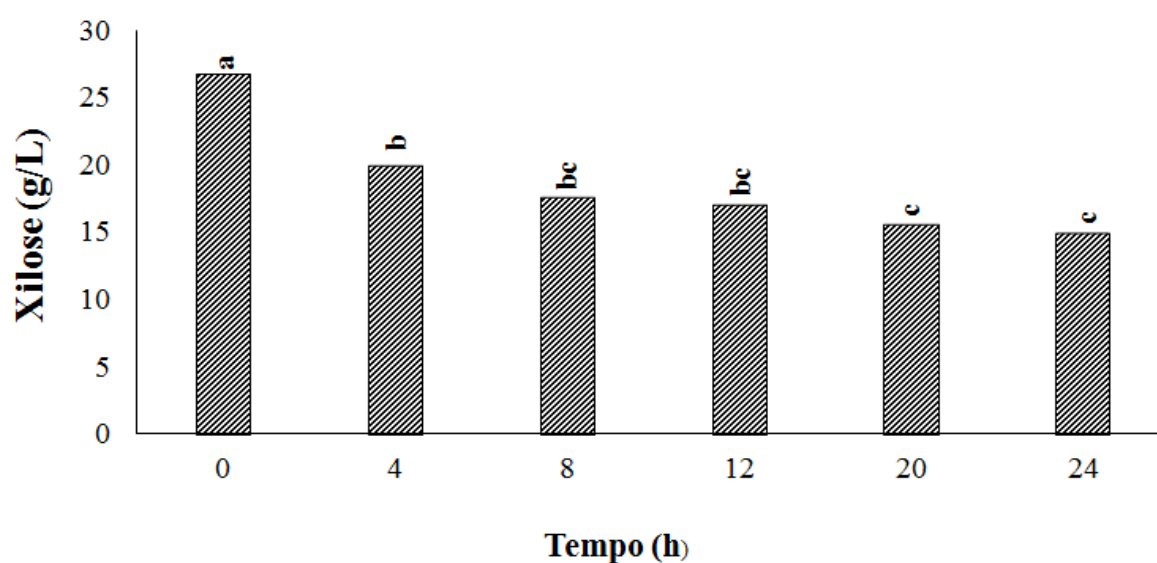


Figura 53. Comparação entre o tempo do consumo de xilose pela levedura PE-2.

4.7.1 Viabilidade Celular

A questão da utilização do sorgo como matéria-prima complementar à cana-de-açúcar para produção de etanol, em início de safra, prescede de informações,

especialmente considerando-se o substrato para a multiplicação do fermento e manutenção do processo fermentativo ao longo do período (FREITA, 2013). Sob esta ótica deve-se considerar a viabilidade das células de leveduras, sua permanência no ambiente fermentador através dos brotamentos e da viabilidade dos brotos formados.

A viabilidade celular da levedura PE-2 foi superior a 91%. Freita (2013) estudando a fermentação do caldo de sorgo sacarino com diferentes leveduras observou que no pé-de-cuba a média de viabilidade celular para levedura PE-2 foi de 76,2%, enquanto Masson (2013) quando se empregou a levedura PE-2 em fermentações de caldo de sorgo sacarino, observou valores de viabilidade celular do pé-de-cuba em torno de 80%. Desta forma, comparando a viabilidade celular com esses autores que utilizaram caldo de sorgo para produção de etanol de 1G, pode-se observar que em licor concentrado do hidrolisado enzimático a levedura teve uma ótima adaptação. Verificou-se uma pequena redução da viabilidade das células a partir de 12 horas de fermentação, o que pode ter ocorrido em função do esgotamento do meio. Entretanto, essa redução não prejudicou o processo, uma vez que durante toda a fermentação manteve-se acima de 80% (Figura 54).

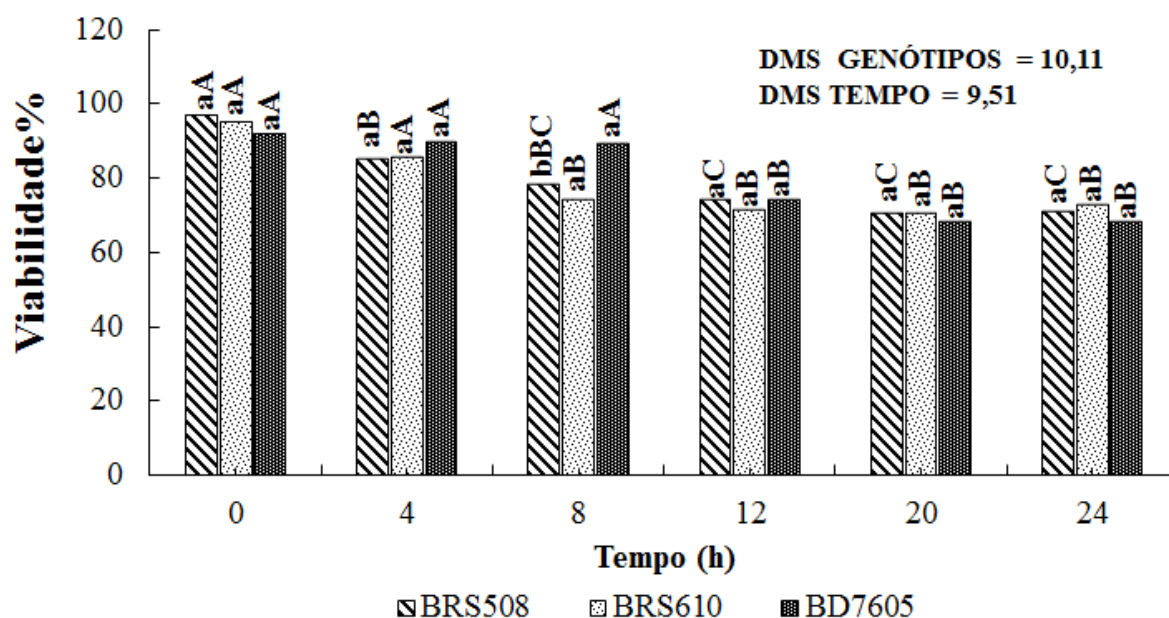


Figura 54. Viabilidade celular. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras

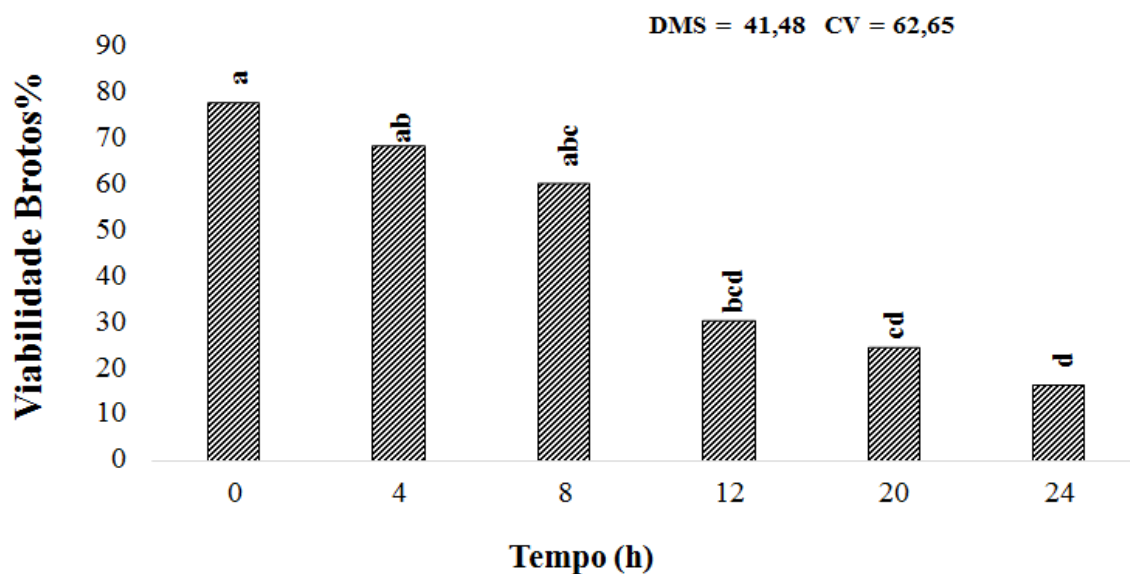


Figura 56. Índice de viabilidade de brotos da levedura PE-2 durante o período de 24hs, em mosto hidrolisado enzimático de bagaço de sorgo.

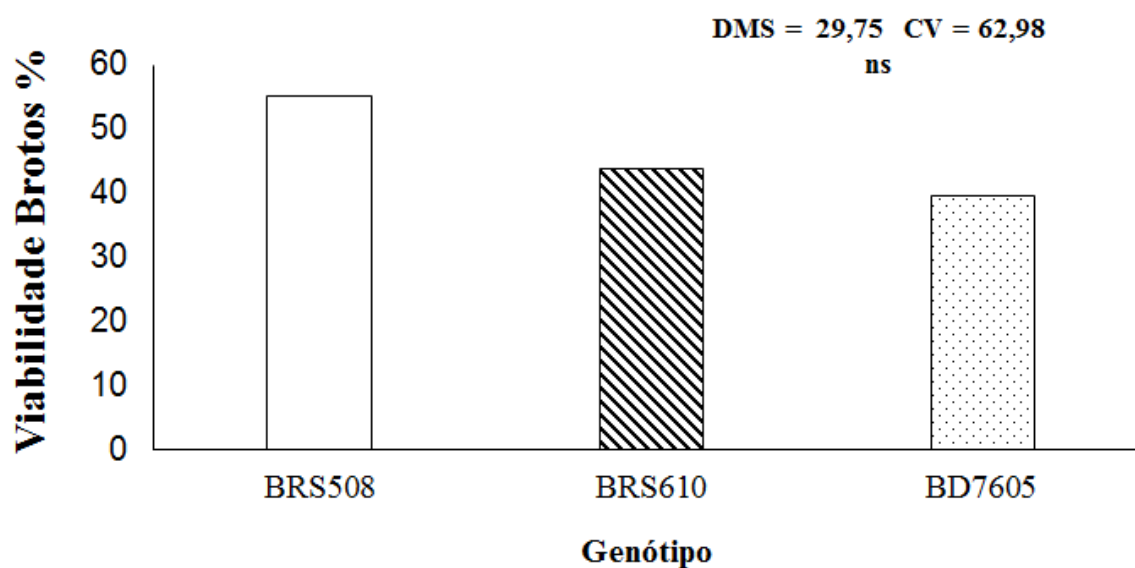


Figura 57. Índice de viabilidade de brotos da levedura PE-2 entre os genótipos de sorgo, em mosto hidrolisado enzimático de bagaço.

Analisando-se os resultados obtidos para os índices de viabilidade celular, viabilidade de brotos e brotamentos pode-se inferir que o comportamento fisiológico das leveduras nas fermentações foi adequado, não havendo quaisquer evidências

de interferências negativas quando se utilizou caldo de sorgo sacarino no preparo do mosto destinado ao processo fermentativo para produção de etanol.

4.7.2 Produção de Etanol e subprodutos

A produção de etanol neste estudo foi positiva para todos os genótipos, sendo crescente a partir de 12 horas de fermentação (Figura 58), com maior intensidade para o genótipo BRS508 e BRS610 que produziram 32 g/L e 42 g/L, com 12 horas de fermentação, respectivamente. Ao final de 24 horas obtiveram-se produtividade de 11,83 g etanol/Kg bagaço M.S. (BRS508, sacarino), 12,28 g etanol/kg bagaço M.S. (BRS610, forrageiro) e 7,79 g etanol/kg bagaço M.S. (BD7605, biomassa) de etanol.

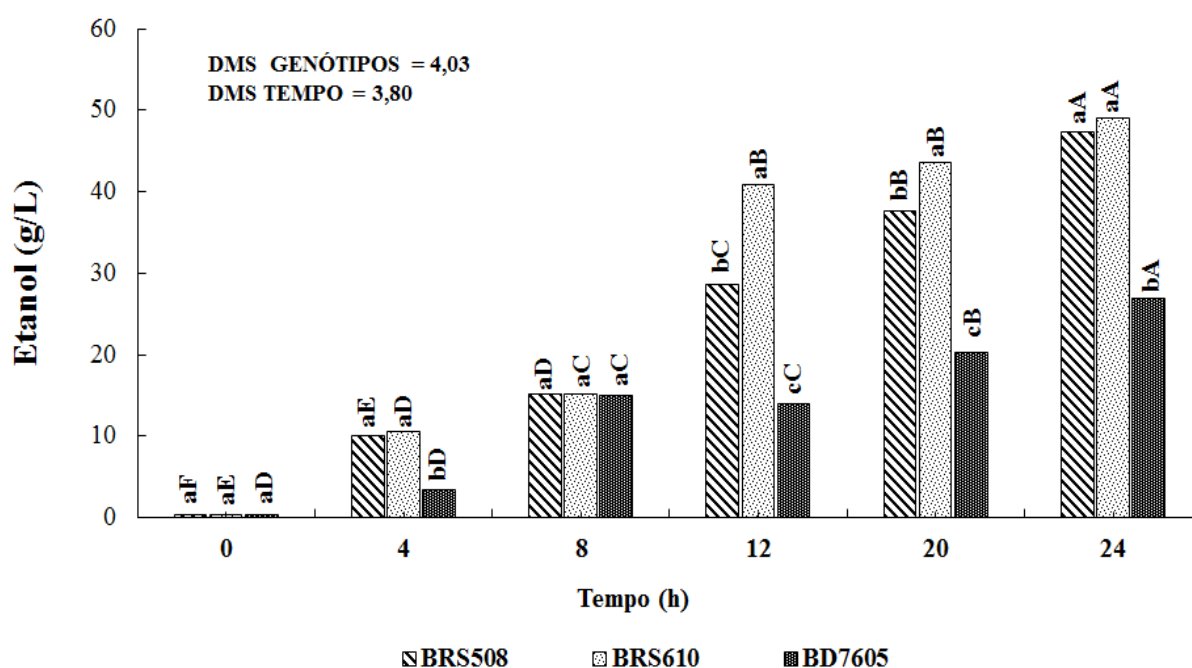


Figura 58. Produção de Etanol ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo.

Os principais ácidos encontrados na fermentação alcoólica são o succínico, acético e láctico. O ácido acético (Figura 59) é um produto formado em pequenas quantidades, enquanto o ácido láctico é o principal metabólito produzido pelas bactérias lácticas. As presenças de ácidos orgânicos, como o acético e láctico, resultam em um 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).

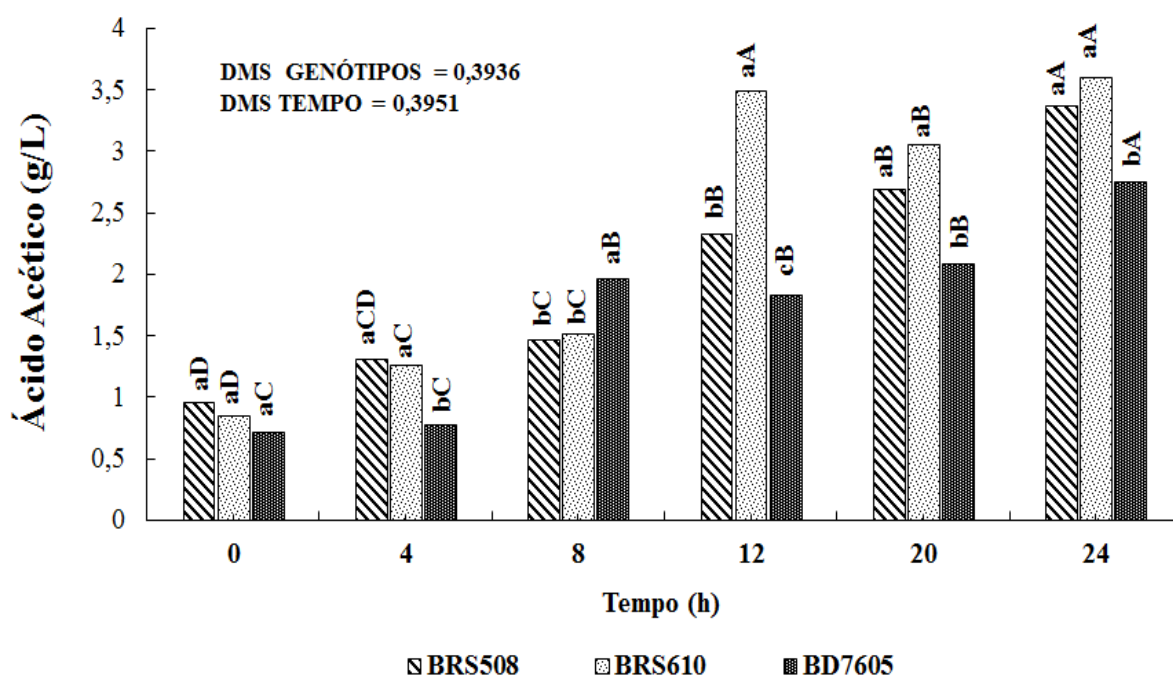


Figura 59. Produção de Ácido Acético ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo.

Os maiores teores de glicerol (Figura 60) ocorreram nas 12 horas da fermentação de mosto para o genótipo BRS610 com 13,51g/L. Ao final do processo ambos os genótipos BRS508, BRS610 e BD7605 produziram 13,81g/L, 13,48 e 9,68g/L, respectivamente. O glicerol é um composto secundário que se forma na

mesma via do etanol e é inversamente proporcional à sua produção, portanto o ideal de uma fermentação é a menor produção possível de glicerol (AMORIM et al., 1996).

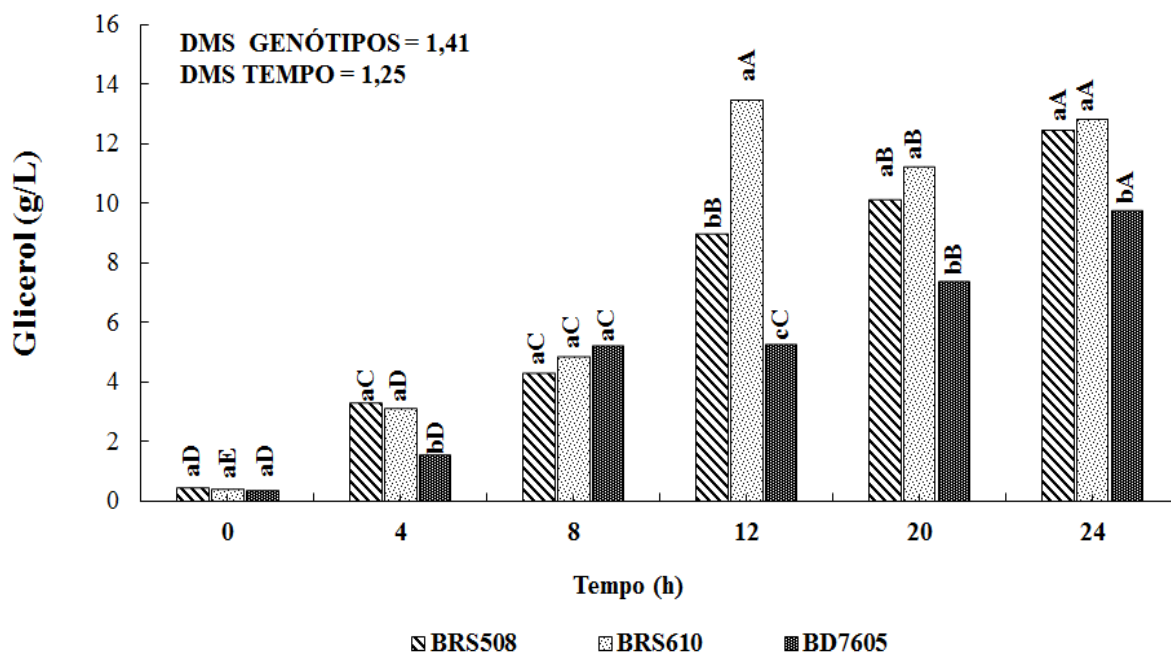


Figura 60. Produção de Glicerol ao longo do processo fermentativo. Interação entre genótipos de sorgo sacarino (BRS508), forrageiro (BRS610) e energia (BD7605) e tempo de fermentação. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de cada tempo de fermentação. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada genótipo de sorgo.

4.8 Produtividade

O resumo dos resultados observados no processo fermentativo de etanol 2G deste trabalho encontram-se na Tabela 12, juntamente com os resultados de etanol 1G obtidos com o BRS610 por Freita (2013), com o BRS 508 por Silva (2014) e valores estimados para o BD7605 em função dos resultados qualiquantitativos obtidos por Bolonhezi et al. (2015).

Os 3 genótipos estudados apresentaram produtividades elevadas e similares de massa verde, sendo que de um modo geral valores da ordem de 40-45, 50-60, e 50-60 t.ha⁻¹ respectivamente para sorgos sacarinos, forrageiros e biomassa, são considerados valores mais próximos dos encontrados em áreas comerciais. Os

valores empregados na Tabela 12, caracterizariam um patamar de excelente produtividade para os materiais estudados.

A produção de bagaço seco foi cerca de 1/3 maior no sorgo biomassa, enquanto que a quantidade de caldo foi de 1/4 maior nos sacarino e forrageiro. Os teores de açúcares totais foram 75% maiores no sorgo sacarino e 50% maiores no sorgo forrageiro em relação ao biomassa. Em função disso a produção de etanol 1G foi ao redor de 4000 L.ha⁻¹ para o sorgo sacarino, sendo que o forrageiro atingiu 70% deste valor e o biomassa cerca de 40%.

Os rendimentos observados para a produção de etanol 2G na presente pesquisa por quilograma de matéria seca de bagaço utilizado foi de 59,38 g de etanol para o sorgo sacarino, sendo 25% menor no forrageiro e 60% menor no biomassa. Desse modo, a produção por área foi de 1301,48; 964,82 e 895,52 L de etanol 2G.

Somando-se o etanol 1G mais 2G, chega-se a 5254,28; 3787,92 e 2461,52 L.ha⁻¹ respectivamente para o BRS508, BRS610 e BD7605. Se considerarmos as produtividades médias obtidas em áreas comerciais, teríamos a produção de 3005,5; 2730,5 e 1842,0 L.ha⁻¹, respectivamente para o BRS508, BRS610 e BD7605, denotando que o sorgo sacarino desponta em função da produtividade mas principalmente pela qualidade da matéria prima, em termos de açúcares fermentescíveis presentes no caldo (que apresentou rendimento de 81,8 L etanol por L de caldo) como também do bagaço (rendimento de 75,23 L etanol por kg de bagaço seco).

Considerando-se a produção total de etanol e a produtividade de massa verde, tem-se que o rendimento de etanol foi de 70,7; 49,6 e 33,5 L por tonelada de massa verde processada para 1G + 2G, respectivamente para os sorgos sacarino, forrageiro e biomassa.

Almodares e Hadi (2009) relataram o potencial de produção de 3000 L/ha de etanol 1G, utilizando sorgo sacarino. Ratnavathi et al. (2010), obtiveram valores de 1570 L/ha com a variedade Wray, e até 4500 L/ha com a variedade SSV 84. Produção de 720,20 L/ha, com a cultivar Thor, e até 1051,53 L/ha com o cultivar Della, foram obtidos por Davila-Gomez et al. (2011). Freita (2013) trabalhando com 2 genótipos de sorgo sacarino (CVSW80007 e CVWS80147) e um forrageiro

(BRS610), obteve de 996,3 a 1.530,0 L/ha de etanol de primeira geração, para colmos sem folhas e com folhas, dos três genótipos, aos 135 d.a.s., em um ano em que a produtividade foi significativamente influenciada pelo clima. Quanto ao rendimento fermentativo, Silva (2014) observou-se valores de 74 L/ha de etanol de primeira geração para o genótipo BRS508. Resultados inferiores foram observados por Masson (2013) que utilizando sorgo sacarino obteve produção média de bioetanol de 40,99 L/t e 1865,62 L/ha. Avaliando algumas variedades de sorgo sacarino e híbridos com capim Sudão durante 3 anos, Jóvér (2014) obteve uma produção média de 2425 a 4043 l/ha a partir do caldo.

Maw et al. (2016) avaliaram durante 3 anos o comportamento do sorgo sacarino em resposta á adubação nitrogenada, e observaram que na dose de N otimizada, o sorgo sacarino produziu 16,8 t/ha de MS de bagaço, cerca de 9100 L/ha de caldo, com potencial de produzir 7488 L de etanol/ha. Barcelos (2012) calculou valores de 85 L/t de caldo de etanol 1G, 247 L/t de bagaco de etanol 2G, mais 28,5 L/t de grãos de etanol 1G, totalizando 13.600 L/ha, dos quais 7410 de etanol 2G. Li et al. (2013) obtiveram a partir de sorgo sacarino na China um rendimento de etanol a partir do caldo de 62,7 L/t de MV de colmos e para o material lignocelulósico conseguiram produzir 29,2 L/t MV de colmos totalizando 91,9 L/t de colmos.

Empregando sorgo forrageiro submetido a pré-tratamento ácido, tratamento enzimático, com fermentação e sacarificação simultânea, Dien et al. (2009) observaram rendimentos da 98,4 a 129,9 g de etanol/kg de MS processada. Concluíram também que a utilização de sorgos forrageiros com menor teor de lignina beneficia significativamente a eficiência de conversão de matérias lignocelulósicas em açúcares e etanol.

No Brasil tem-se hoje um cenário de produção de etanol de 7000 a 8000 L.ha⁻¹ a partir de caldo de cana-de-açúcar, mais uma potencialidade de 6000 a 7000 L.ha⁻¹ processando os resíduos lignocelulósicos agroindustriais, perfazendo um total de 13000 a 15000 L.ha⁻¹. Considerando o ciclo médio da cultura como de 12 meses, tem-se uma produção de 1083,3 a 1250,0 L.ha⁻¹.mes, um pouco inferior ao obtido quando se considera este rendimento do sorgo sacarino e, superior ao do forrageiro e principalmente do biomassa. Deve-se ainda considerar que esta produção do sorgo ocorrerá no período de entressafra e grande parte em áreas de renovação dos

canaviais, o que possibilitará um uso mais intensivo da terra, verticalizando ainda mais a produção.

Desse modo poderíamos ter uma produtividade média de 13000 a 15000 L.ha⁻¹ e, se a reforma dos canaviais ocorrer a cada 5 anos, mais 1051,0 L.ha⁻¹ provenientes do sorgo sacarino, o que equivale a dizer que o aproveitamento integral da cana mais o plantio do sorgo em áreas de reforma no período de entressafra dobrariam a atual produção de etanol, o que viria a contribuir sobremaneira para o suprimento das necessidades de combustíveis do país por mais 10-15 anos sem a necessidade de ampliação das áreas de cultivo.

Tabela 12. Produtividade de etanol de primeira e segunda geração.

| ATRIBUTOS | GENÓTIPOS | | |
|----------------|---|---------|---------|
| | BRS508 | BRS610 | BD7605 |
| | PRODUTIVIDADE t/ha | | |
| MASSA VERDE | 74,3 | 76,3 | 73,5 |
| MASSA SECA | 24 | 26,7 | 41 |
| BAGAÇO ÚMIDO | 26 | 25,2 | 35,36 |
| BAGAÇO SECO | 17,3 | 16,8 | 24,9 |
| CALDO | 48,3 | 51,1 | 38,14* |
| | PRODUTIVIDADE DE ETANOL 1G | | |
| | BRS508 | BRS610 | BD7605 |
| L/t SORGO | 53,2 | 37 | 22,53 |
| L/kg CALDO | 81,8 | 55,2 | 43,44 |
| L/ha | 3.952,8 | 2.823,1 | 1.656,9 |
| | PRODUTIVIDADE DE ETANOL 2ª GERAÇÃO g de etanol.kg ⁻¹ de bagaço seco | | |
| FERMENTAÇÃO C5 | 47,55 | 33,05 | 17,74 |
| FERMENTAÇÃO C6 | 11,83 | 12,28 | 7,79 |
| SOMA 1G + 2G | 59,38 | 45,33 | 25,53 |
| L/ha | 1.301,48 | 964,82 | 805,52 |
| | TOTAL DE ETANOL 1G + 2G | | |

| | | | |
|------------------|------------------------------|-----------|-----------|
| L/ha | 5.254,28 | 3.787,92 | 2.461,52 |
| | PRODUTIVIDADE POR MES | | |
| CICLO DA CULTURA | 105 D.A.S | 120 D.A.S | 140 D.A.S |
| L/ha/mês | 1.501,22 | 946,98 | 527,47 |

4.9 Nutrientes

A disponibilidade de nutrientes para o processo industrial de produção de etanol é de extrema relevância. Há inúmeras informações sobre exigências de macro e micronutrientes do mosto a ser fermentado por leveduras, no procedimento de primeira geração. Porém, quando se utiliza resíduos ligno-celulósicos, após os processos de pré-tratamento e destoxificação, que serão convertidos no etanol de segunda geração, não há relatos na literatura.

No presente estudo avaliou-se os teores de nutrientes nos bagaços de sorgo *in natura*, pré-tratado e após hidrólise enzimática.

Quantificou-se o teor de nitrogênio no bagaço do sorgo BRS508 onde se pode verificar que o teor no bagaço *in natura* é 93,5% superior ao do bagaço pré-tratado, e 77% maior que no material após hidrólise enzimática. Tal resultado revela um comportamento de redução dos nutrientes contidos no bagaço ao longo do processo para produção de etanol de segunda geração. Para o teor de nitrogênio presentes nos bagaços do sorgo BRS610, observou-se o mesmo comportamento nas três etapas do processo, sendo a redução do bagaço *in natura* para o pré-tratado de 62% e 88% após a hidrólise enzimática. No BD7605, notou-se uma redução do material pré-tratado de 46,66% em relação ao *in natura*, e no material após hidrólise ocorreu incremento de nitrogênio da ordem de 227% em relação ao *in natura*.

Quando se avaliou os três genótipos (Figura 61), o BRS508 foi o que possuía o maior teor de nitrogênio e o BD7605 foi o que apresentou menor valor no bagaço *in natura*. O comportamento de decréscimo do nitrogênio quando se realizou o pré-tratamento ocorreu em todos os genótipos bem como, o aumento nos teores do material após a hidrólise enzimática. A redução observada após o pré-tratamento pode ter sido em função de reações químicas ocorridas entre os compostos nitrogenados presentes no material e o ácido sulfúrico utilizado nesta fase.

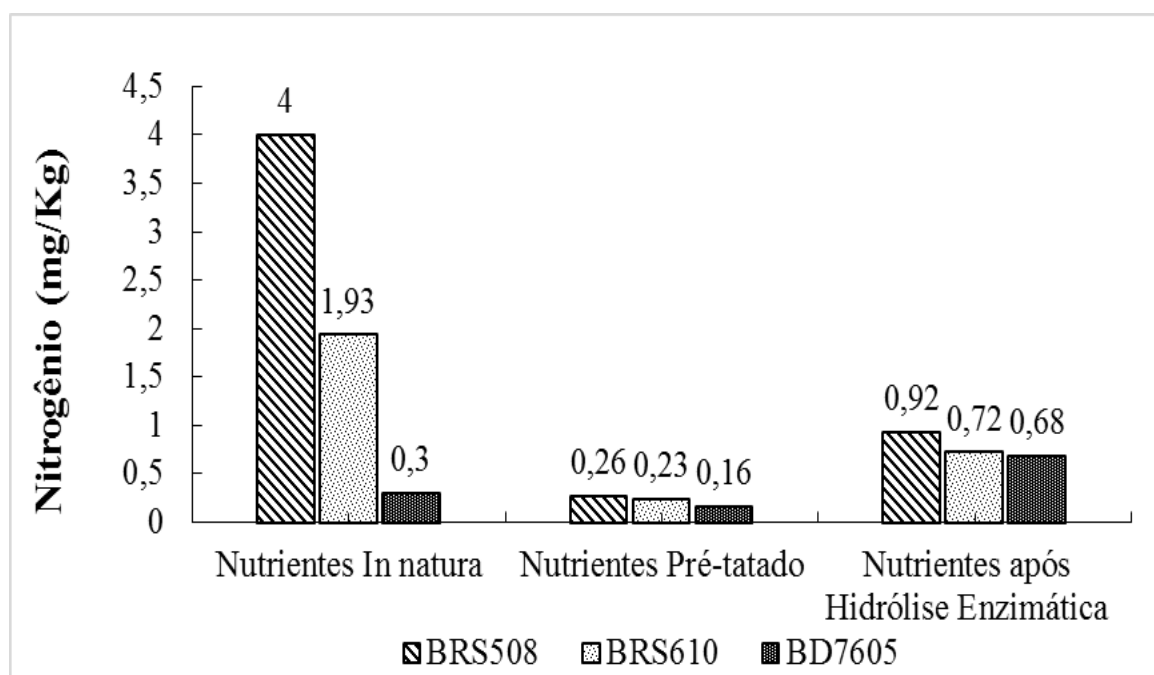


Figura 61. Resultados médios obtidos para os Teores de Nitrogênio, para os bagaços dos genótipos: BRS508, BRS610 e BD7605: In natura, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática.

Elevados teores de potássio foram verificados no material in natura do BRS508, seguido de uma redução significativa no pré-tratado da ordem de 92,6%, e do material após hidrólise enzimática (96,6%). Acredita-se que o pré-tratamento promoveu esta redução inicial. De modo semelhante ao BRS508 foi verificado para o BRS610, houve reduções grandiosas no bagaço in natura em relação ao pré-tratado e hidrólise enzimática, sendo da ordem de 99,24% e 97,21% respectivamente, entretanto deve-se ressaltar que ocorreu um aumento de 72,97% de potássio da etapa de pré-tratamento para o da hidrólise enzimática. O genótipo BD7605 teve comportamento similar ao BRS508, para o qual do bagaço in natura até posterior hidrólise enzimática ocorreu considerável redução, sendo que ao final do processo esta foi da ordem de 98,95%.

Analisando o teor de potássio nos genótipos BRS508, BRS610 e BD7605 (Figura 62), pode-se identificar que o bagaço in natura do BD7605 foi o que apresentou maior teor, porém no pré-tratamento e após a hidrólise enzimática todos os genótipos tiveram reduções similares, apresentando teores similares. O maior

teor inicial de K no BD7605 pode estar relacionado com a maior extração deste nutriente que este tipo de sorgo apresenta, como foi observado por Santos et al. (2015).

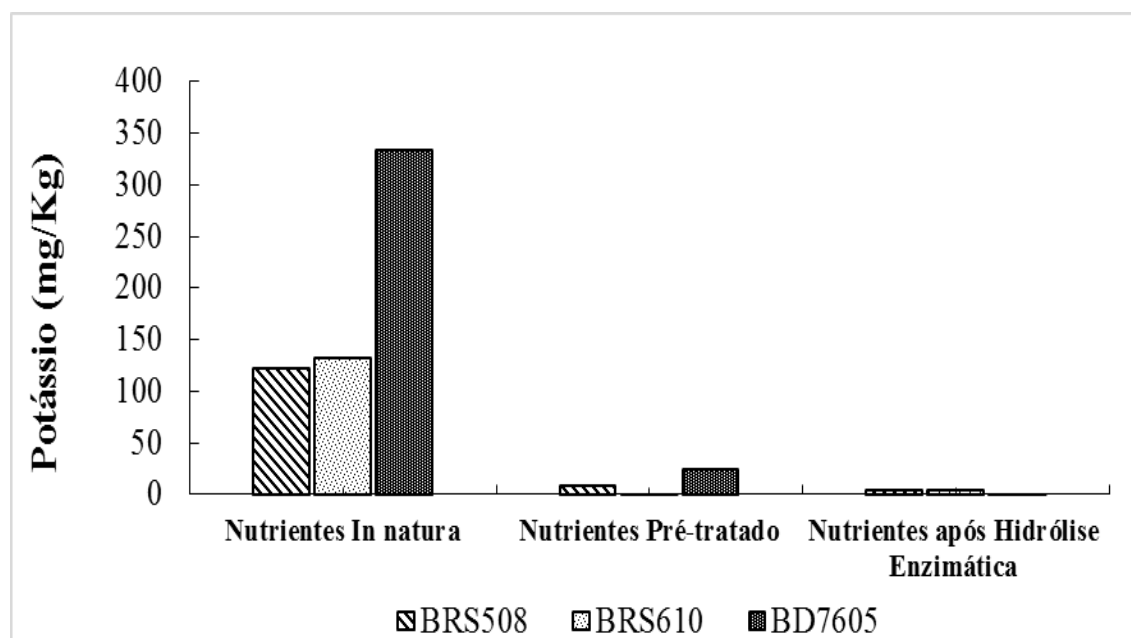


Figura 62. Resultados médios obtidos para os Teores de Potássio, para os bagaços dos genótipos: BRS508, BRS610 e BD7605: In natura, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática.

Os teores de cálcio (Figura 63) para os genótipos estudados apresentaram comportamento similar de redução ao longo do processo de produção do etanol 2G. Maiores valores foram observados para o BD7605 no material in natura. Nota-se que o cálcio não sofreu redução nas últimas duas etapas deste processo.

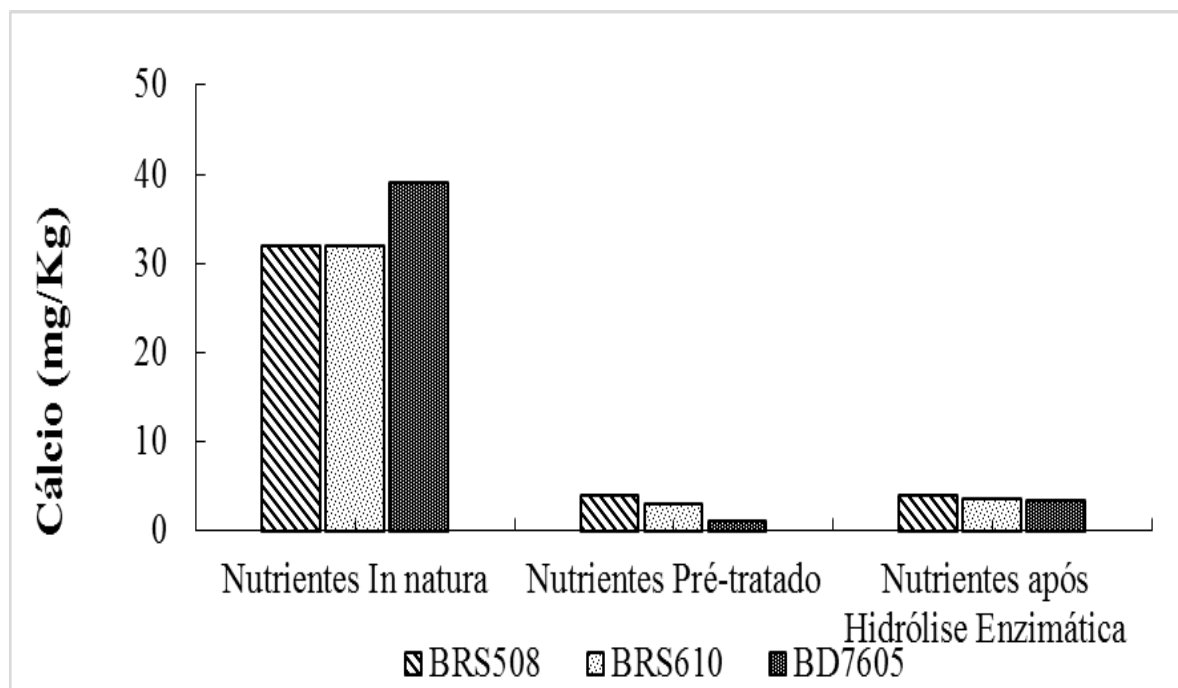


Figura 63. Resultados médios obtidos para os Teores de Cálcio, para os bagaços dos genótipos: BRS508, BRS610 e BD7605: In natura, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática.

Os teores de magnésio (Figuras 64 a 66) foram bem superiores no in natura e, extremamente baixos no pós-hidrolisado, demonstrando que neste nutriente o pré-tratamento e a hidrólise resultarem em drástica redução.

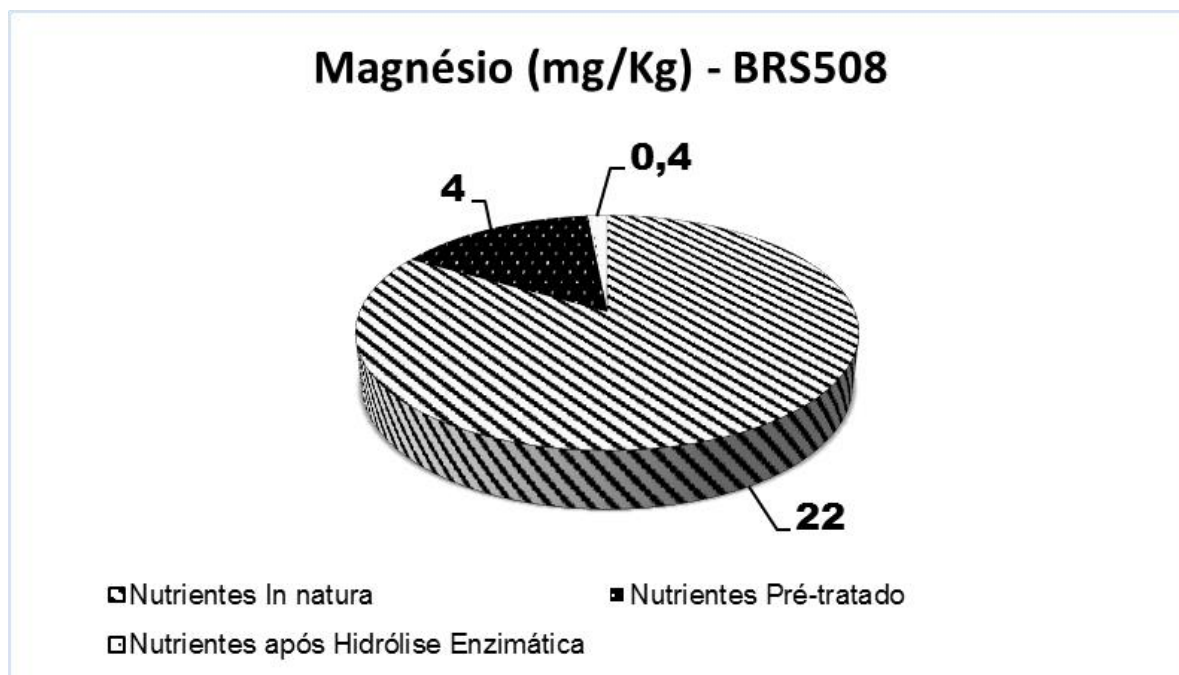


Figura 64. Resultados médios obtidos para o Teor de Magnésio, para o bagaço do sorgo BRS508: In natura, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática.

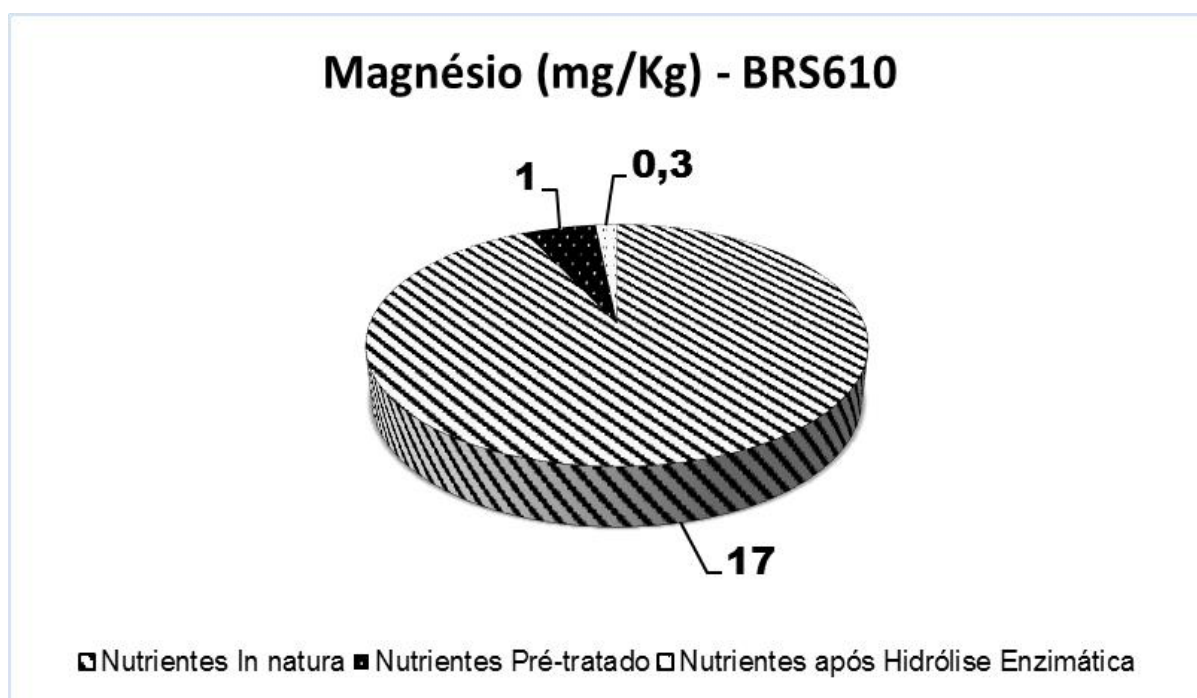


Figura 65. Resultados médios obtidos para o Teor de Magnésio, para o bagaço do sorgo BRS610: In natura, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática.

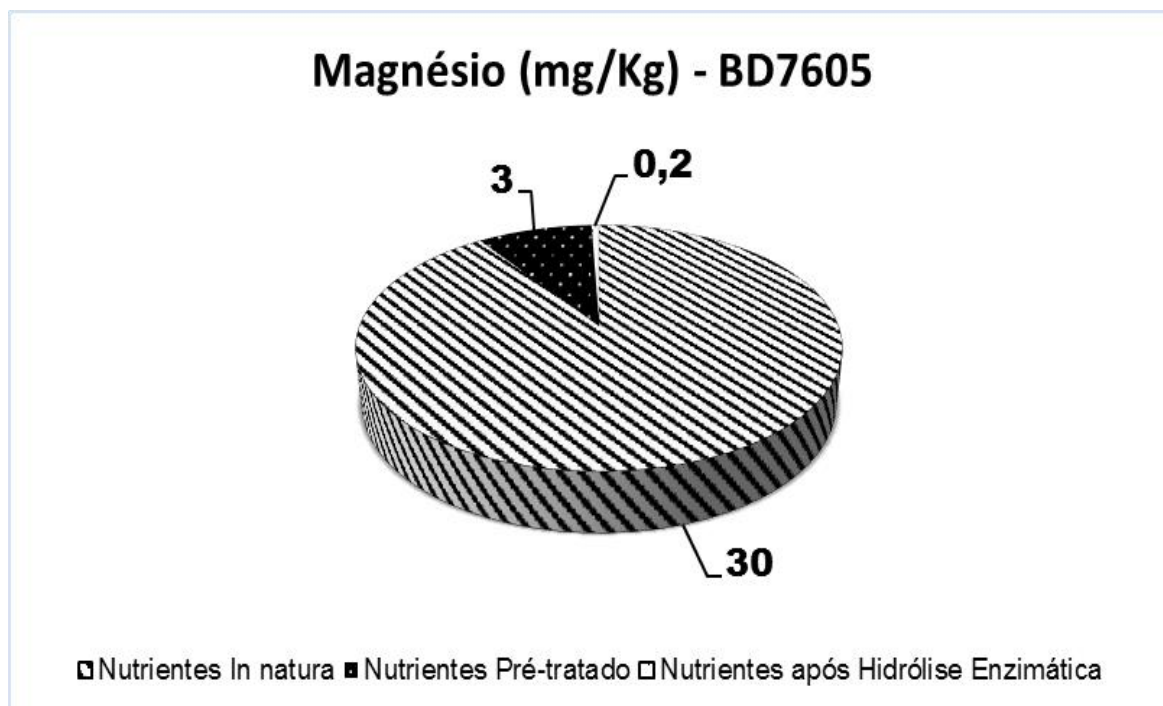


Figura 66. Resultados médios obtidos para o Teor de Magnésio, para o bagaço do sorgo BD7605: In natura, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática.

Os teores de zinco no material in natura apresentaram maiores valores no sorgo sacarino (Figura 67) decrescendo para o forrageiro (Figura 68) e para o biomassa (Figura 69). No material obtido após a hidrólise enzimática os teores dos genótipos foram similares e da ordem de 30 mg.kg^{-1} .

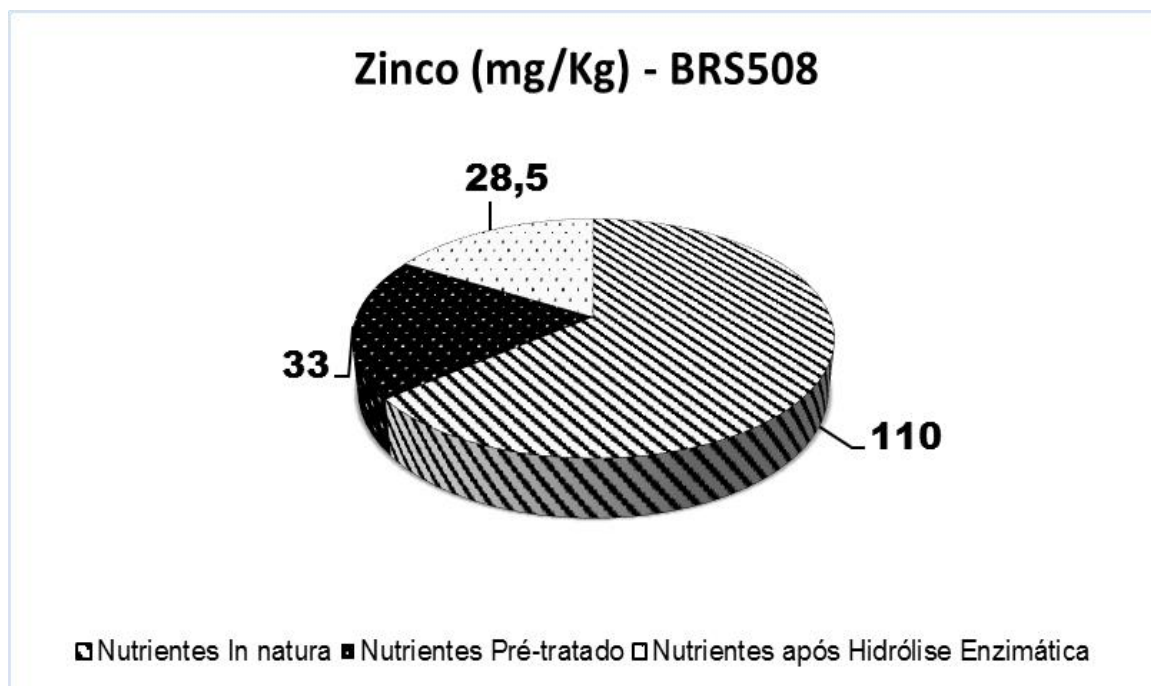


Figura 67. Resultados médios obtidos para o Teor de Zinco, para o bagaço do sorgo sacarino: *In natura*, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática.

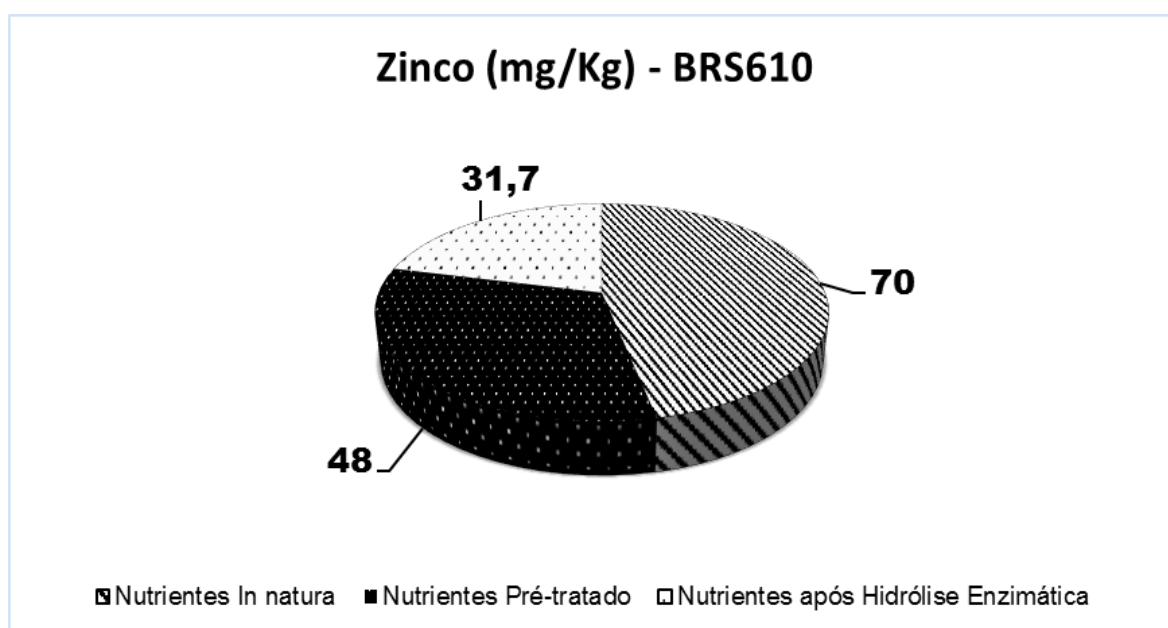


Figura 68. Resultados médios obtidos para o Teor de Zinco, para o bagaço do sorgo forrageiro: *In natura*, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática.

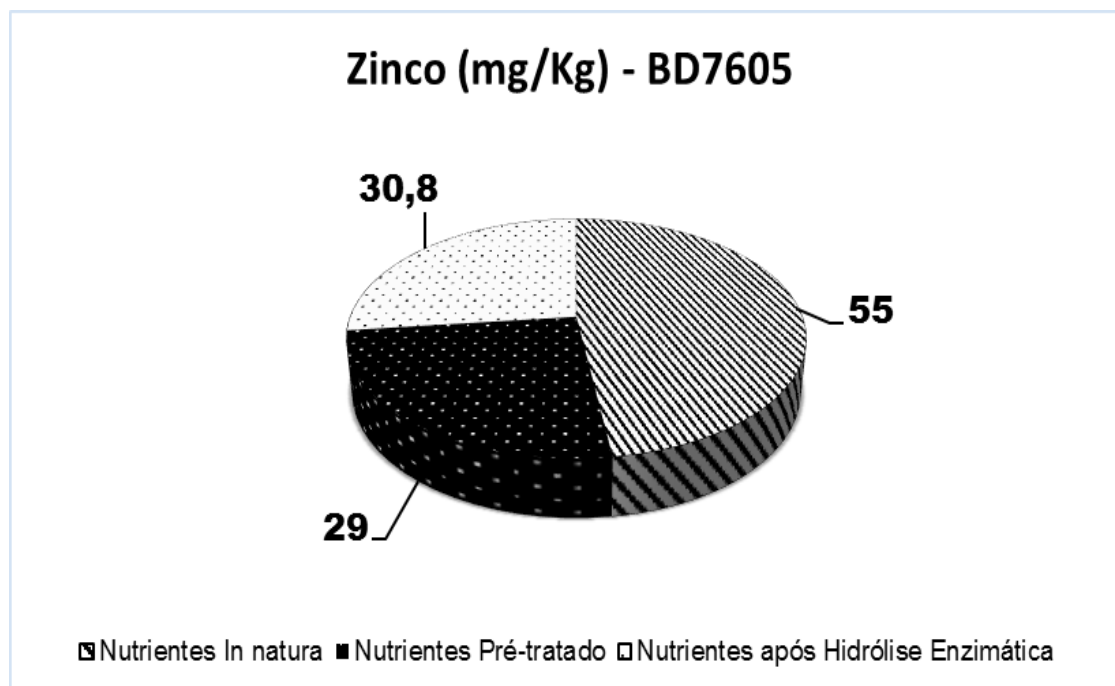


Figura 69. Resultados médios obtidos para o Teor de Zinco, para o bagaço do sorgo biomassa: *In natura*, Pré-tratado e após Hidrólise Enzimática.

Os microrganismos utilizados na fermentação etanólica necessitam de fonte de carbono elaborada, glicose ou outro açúcar, como fonte de energia e de esqueletos de carbono. A condição para desenvolvimento e fermentação deve conter substâncias que atendam às suas necessidades nutricionais, fornecendo-lhes: C, H, N, O, P, K, S, Mg, Fe, Zn, vitaminas, e outros. Assim, as presenças destes nutrientes em quantidades adequadas e balanceadas interferem no desempenho e viabilidade das leveduras, e resultam em excelente rendimento fermentativo. Tais nutrientes devem ser fornecidos pelo material que será utilizado para hidrólise enzimática após o pré-tratamento, e ou adicionados ao mosto.

Para a geração de energia as unidades de produção sucroalcooleiras do Brasil empregam a combustão de bagaço em caldeiras a vapor, porém outras matérias-primas têm sido pesquisadas, no entanto para que se desenvolva projetos mais adequados desses equipamentos, faz-se mister o conhecimento das características físicas e químicas destes materiais.

De um modo geral, segundo Jenkins et al. (1996), matérias destinados a combustão que se originam de plantas herbáceas, tem em sua composição elementos inorgânicos principalmente o potássio, o silício, o enxofre e o cloro que

em combinação potencializam a formação de incrustações e de depósitos fundidos ou sinterizados nas superfícies de transferência de calor e nos refratários das cavidades das fornalhas, submetidas a transferência de calor por radiação.

A presença de maiores teores de cinzas (BIZZO et al., 2014) no material empregado para combustão resultam em menor poder calorífico e maior desgaste dos equipamentos, constituindo-se em restrições para seu emprego. Desse modo se a destinação do material obtido após a hidrólise enzimática para a geração de energia em caldeiras a vapor, a sua composição em minerais deve ser levada em consideração para que menores restrições de seu emprego ocorram.

Carvalho (2015) também quantificou elevados teores de K no sorgo biomassa, da ordem de duas vezes aos encontrados no bagaco de cana aliado a elevados teores de cloro (cinco vezes mais), porém valores 50% menores de sílica.

4.9 Poder calorífico dos resíduos

O desempenho energético dos bagaços de sorgo in natura, pré-tratado e dos resíduos obtidos após a etapa de hidrólise enzimática, caracterizados através das determinações do PCS, PCI e PCU encontram-se nas Figuras de 70 a 72.

As análises realizadas de PCS (Figura 70) indicam que os maiores valores no material in natura foram obtidos para o sorgo biomassa ($4279 \text{ Kcal.kg}^{-1}$) seguidos pelo sorgo forrageiro ($4248 \text{ Kcal.kg}^{-1}$) e sorgo sacarino ($4167 \text{ Kcal.kg}^{-1}$). O PCS do sorgo biomassa determinado por Carvalho (2015) foi de $4201 \text{ Kcal.kg}^{-1}$, um pouco menor ao constatado nesta pesquisa, e que pode estar relacionado com o genótipo empregado. Este autor afirma ainda que o PCS observado para o sorgo biomassa foi inferior ao determinado no bagaco de cana e similar aos da palha e folhas de cana. Castro et al. (2015) observaram valores de PCS de genótipos de sorgo biomassa de $4411 \text{ Kcal.kg}^{-1}$, similares aos determinados nesta pesquisa.

Este comportamento dos genótipos esta relacionada com maior teor de lignina apresentado pelo sorgo biomassa (Tabela 11), uma vez que este componente extraído do bagaco de cana apresenta PCS de 5272 a $5363 \text{ Kcal.kg}^{-1}$ segundo Horst (2013). Diniz et al. (2004) e Paula et al. (2011), consideram também

que pode estar também relacionada aos maiores teores de celulose, como no caso do sorgo forrageiro, que são positivamente correlacionados a maior poder calorífico.

O mesmo comportamento foi observado para o PCI no material pre-tratado (Figura 71) quando o BD7605, BRS610 e BRS508 apresentava respectivamente 4359; 4429 e 4227 Kcal.kg⁻¹.

Desse modo, quando se realizou o pre-tratamento, com a solubilização das hemiceluloses, o resíduo apresentou um acréscimo de 1,4 a 4,0% no seu poder calorífico. Fato semelhante ocorreu quando foi realizada a hidrólise enzimática (liberação da celulose), cujos resíduos finais (Figura 72) apresentaram incremento da ordem de 6,3 a 8,0% em relação ao material *in natura*. Desse modo o resíduo final apresentou PCS de 4651; 4516 e 4500 Kcal.kg⁻¹, respectivamente para o sorgo biomassa, forrageiro e sacarino. Conforme se verifica na Tabela 11, ocorreu aumento proporcional nos teores de lignina de todos os genótipos estudados, ao longo do processo de obtenção do etanol 2G, com maior efeito do pre-tratamento, e que estão positivamente correlacionados com os teores de lignina (HORST, 2013) e ou teores de celulose (DINIZ et al., 2004) presentes nos materiais.

Como observado para o PCS, ocorreu para o PCI e o PCU nas mesmas condições de amostragem (Figuras 70 a 72). Entre o material *in natura* e o resíduo final após hidrólise o PCU apresentou um acréscimo de 14 a 18%, resultando em 3953; 3902 e 3811 Kcal.kg⁻¹ respectivamente para o sorgo biomassa, forrageiro e sacarino. Castro et al. (2015) observou PCI de 2845 Kcal.kg⁻¹ com umidade do material de 62%, para os genótipos biomassa estudados.

Face aos resultados obtidos pode-se inferir que o resíduo gerado neste processo de produção 2G a partir de sorgo, poderá ser empregado como fonte de bioenergia. Deve-se salientar que o teor de água presente no material observado logo após sua obtenção, sem qualquer tratamento de secagem, interferirá nos resultados finais do potencial calorífico do material.

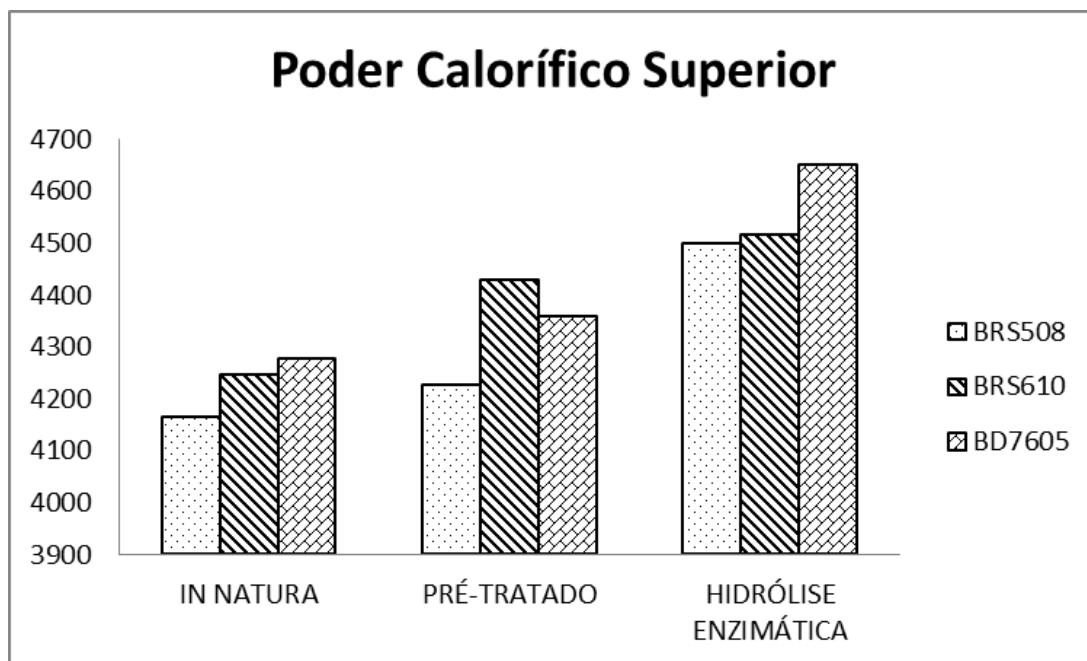


Gráfico 70. Média geral para o PCS (kcal.kg^{-1}) para os genótipos BRS508, BRS610 e BD7605 in natura, pré-tratado e após hidrólise enzimática.

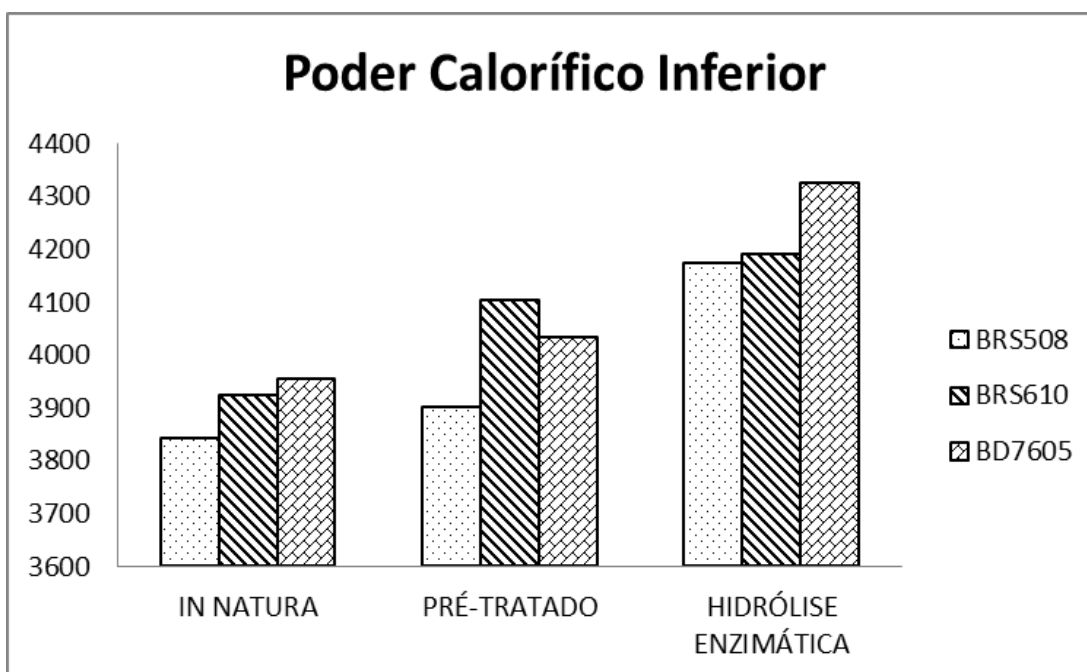


Gráfico 71. Média geral para PCI (kcal.kg^{-1}) para os genótipos BRS508, BRS610 e BD7605 in natura, pré-tratado e após hidrólise enzimática.

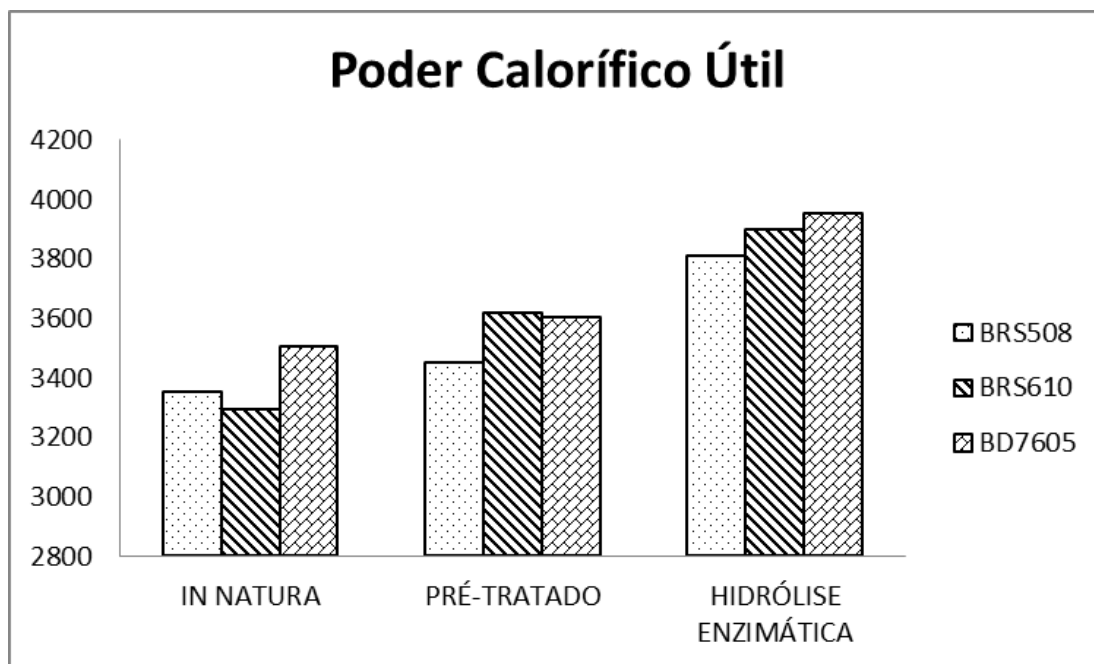


Gráfico 72. Média geral para o PCU (kcal.kg^{-1}) para os genótipos BRS508, BRS610 e BD7605 in natura, pré-tratado e após hidrólise enzimática.

5.0 CONCLUSÕES

Considerando-se as condições em que os experimentos foram desenvolvidos e a metodologia empregada, os resultados obtidos permitem concluir que:

- A adequação do pré-tratamento com o tempo de 20 minutos, 120^oC, 0,5% (v/v) de H₂SO₄, em reator de 40L, possibilitou a remoção da fração hemicelulósica de modo eficiente, produzindo hidrolisado com alta concentração de xilose de 97g/L para o BRS508, 91g/L BRS610 e 81 g/L para o BD7605.
- Para fermentação do licor rico em pentoses utilizou-se a levedura LJ03 que foi identificada como *Pichia kudriavzevii*.
- *P. kudriavzevii* foi eficiente em desdobrar as pentoses e hexoses, resultando em eficiência calculada final de etanol de 26,96% (sacarino), 18,95% (forrageiro) e 14,62% (biomassa) após 72 horas.
- A hidrólise enzimática foi eficiente possibilitando a fermentação com PE-2 por 24 horas, produzindo 11,83; 12,28 e 7,79g etanol/kg bagaço m.s., para os genótipos sacarino, forrageiro e energia, respectivamente;
- Nutrientes como C, H, N, O, P, K, S, Mg, Fe, Zn devem ser fornecidos pelo material que será utilizado para hidrólise enzimática após o pré-tratamento, e ou adicionados ao mosto.
- O poder calorífico (PCS, PCI e PCU) dos resíduos gerados na produção de etanol 2G, aumentou com o desenvolvimento do processo, sendo que ao final apresentaram 3811; 3902 e 3953Kcal.kg⁻¹ respectivamente para o sorgo sacarino, forrageiro e biomassa.
- A análise do processo de produção de etanol 2G empregado caracterizou que a conversão em etanol dos bagaços de sorgo sacarino, sorgo forrageiro e biomassa, resultaram em rendimento total de 59,38; 45,33 e 25,53 litros de

etanol.t⁻¹ de m.s. respectivamente, e produção de 1.301,48, 964,82 e 805,52 litros de etanol por hectare respectivamente.

- O genótipo BRS508 (sacarino) foi o que apresentou maior produção de etanol de segunda geração em comparação aos BRS610 (forrageiro) e BD7605 (Biomassa).

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.

AGBOR, V. B., CICEK, N., SPARLING, R., BERLIN, A., LEVIN, D. B., 2011. "Biomass pretreatment: fundamentals toward application". **Biotechnology Advances**, v.29, pp. 675-685.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Res.** 25, 3389–3402.

ALVES, R.E. **Caracterização de fibra lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas ópticas de alta resolução.** 115f. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Instituto de Química e Física de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

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

ANDERSEN, NATALIJA. **Enzymatic Hydrolysis of Cellulose - Experimental and Modeling Studies.** BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Denmark, 2007. Tese de doutorado.

ARANTES, T.M. (2009). Uso de soluções hidrotrópicas na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar. 145p. dissertação (Mestrado). Instituto da química de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos, 2009.

ASSUMPÇÃO, Samira Maria Nonato de. **Pré-tratamento químico combinado do bagaço da cana visando a produção de etanol de segunda geração**. Dissertação (mestrado). 2015. 99 p. Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2015.

BALAT, M., BALAT, H., OZ, C. 2008. "Progress in Bioethanol Processing", **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, pp. 551-573.

BALOGH, D.T (1989). **Efeito de solvente na obtenção de ligninas pelo processo organosolv**. 110p. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1989.

BANERJEE, D. et al. Enhanced saccharification efficiency of lignocellulosic biomass of mustard stalk and straw by salt pretreatment. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 42–49, 2016.

BARCELOS, C. A. **Aproveitamento das frações sacarínea, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] para a produção de bioetanol**. 2012. 334 f. Tese (Doutorado em Ciências (DSc)). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

BASTOS, V.D. **Etanol, álcoolquímica e Biorrefinarias**, 2007. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br>. Acesso em: 12 de dezembro de 2016.

BATISTA, V. A. P., **Avaliação bioenergética de sorgos biomassa, sacarino e forrageiro**. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais. 68p. 2016.

BATISTA-GARCÍA, R. A.; SÁNCHEZ-CARBENTE, M. del R., TALIA Paola, JACKSON, S. A.; O`LEARY N. D.; DOBSON A. D. W., FOLCH-MALLOL, J. L. From lignocellulosic metagenomes to lignocellulolytic genes: trends, challenges and future

prospects. Online Library (wileyonlinelibrary.com); **Biofuels, Bioprod. Bioref.** 10:864–882 (2016)

BEHERA, S., ARORA, R., NANDHAGOPAL, N., KUMAR, S. 2014. “Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass”, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, pp. 91–106.

BELAFI-BAKO, K., KOUTINAS, A., NEMESTOTHY, N., GUBICZA, L. Y., WEBB, C. Continuous enzymatic cellulose hydrolysis in a tubular membrane bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, 38:155-161, 2006.

BÉLAFI-BAKÓ, K.; GUBICZA, L.; KISS, K.; NEMESTÓTHY, N. Hydrolysis of pectin by *Aspergillus niger* polygalacturonase in a membrane bioreactor. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 438-442, 2006.

BHALLA, A. et al. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 751–759, 2013.[bitstream/item/68399/1/brs-508.pdf](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.088)>. Acesso em: 08 de mai. de 2016.

BOLONHEZI, D., CARDOSO, B.M.V., CARVALHO, E.V., SOUZA JR., J.G.A., GARCIA, J.C. Características tecnológicas de sorgo sacarino e biomassa em diferentes estádios fenológicos. **Ciência & Tecnologia: Fatec-JB**, Jaboticabal, v. 7, p.47-51, 2015. Suplemento.

BOMMARIUS, A. S. et al. Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 6, p. 370–381, 2008

BORÉM, A.; PIMENTEL, L.; PARRELLA, R. **Sorgo do plantio à colheita**. Viçosa: UFV, v. 1, 2014.

BRETT, C., WALDON, K. (1996). Cell wall architecture and the skeletal role of the cell wall. In: **Physiology and biochemistry of plant cell walls**, Blackk, M. and Charlwood, B. (Eds), Chapman and Hall, 2nd edition, 44-74.

BURNQUIST, Heloisa Lee. Porque o Brasil deve apoiar a internacionalização do etanol. **Revista Opiniões**, 2007.

BUSSAMRA, B.C. **Melhoramento de coquetéis enzimáticos para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). 2014. 124f. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

CAMPBELL, M.K. Bioquímica, Artmed Editora, 3ª ed., Porto Alegre. 2000.

CARDONA, C. A., QUINTERO, J. A., PAZ, I. C., 2010, "Production of Bioethanol from Sugarcane Bagasse: Status and Perspectives", **Bioresource Technology**. v. 101, pp. 4754-4766.

CARRILLO, M.A. et al. Washing sorghum biomass with water to improve its quality for combustion. **Fuel**, London, v.116, p. 427-431, 2014.

CARVALHO, D.J. **Geração de bioeletricidade em usina sucroalcooleira utilizando bagaço, palha de cana e sorgo biomassa**. Campinas, SP, 2015. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, 2015. 154 p.

CARVALHO, W. **Estudos da obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana com células imobilizadas em gel de alginato de cálcio**. 2004. 110p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2004.

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

CASTRO, F. M. R.; BRUZI, A. T.; NUNES, J. A. R.; PARRELLA, R. A. C.; LOMBARDI, G. M. R.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; LOPES, M. Agronomic and Energetic Potential of Biomass Sorghum Genotypes. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 1862-1873, 2015.

CASTRO, Fernanda Maria Rodrigues. **Potencial Agronômico e Energético de Híbridos de Sorgo Biomassa**. Dissertação (mestrado acadêmico). 2014. 80 p. Universidade Federal de Lavras, 2014.

CHANDEL, A.K; KAPOOR, R.K; SINGH, A; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production. **Bioresource Technology**, v.98 n.10, p1947-1950, 2014.

CHEN, H. FU, X. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. **Renew Sustain EnergRev** 57:468–78, 2016.

CHEN, W., XU, Y., HWANG W., WANG, J. B., 2011, "Pretreatment of rice straw using an extrusion/extraction process at bench-scale for producing cellulosic ethanol", **Bioresource Technology**, v. 102, pp. 10451-10458.

CHUM, H. L.; DOUGLAS, L. J.; FEINBERG, D.A.; SCHROEDER, H.A. (1985). **Evaluation of pretreatments of biomass for enzymatic hydrolysis of cellulose**. NREL, 1985. 77p.

COELHO, A.M.; CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A. Rendimento de milho no Brasil: Chegamos ao máximo? In: **SIMPÓSIO ROTAÇÃO SOJA/MILHO NO PLANTIO DIRETO**, 3., Piracicaba, 2002. CD-Rom (In press)

CORSINO, M.C. **Embrapa retoma produção de sorgo sacarino: A cultivar é uma opção na entressafra da cana-de-açúcar**. 2011. Disponível em:<<http://www.cpt.com.br/noticias/embrapa-retoma-producao-de-sorgo-sacarino>>. Acesso em: 10 de nov. de 2016.

COTTON INCORPORATED, 2011. Disponível em: <http://www.cottoninc.com/corporate/About-Cotton-Incorporated/Cotton-Incorporated-annual-report/2011-Annual-Report/life-cycle-assessment.cfm>. Acesso: 02/12/2016.

DA SILVA, R., FRANCO, C.M.L, GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. **Boletim da SBCTA**, 31 (2):249-260, 1997.

DE MESQUITA, J. P. **Nanocristais de celulose para preparação de bionanocompósitos com quitosana e carbonos nanoestruturados para aplicações tecnológicas e ambientais**. 2012. 189p. Tese (Doutorado em Ciências-Química), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

DEN HAAN, R. et al. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 9, n. 1, p. 87–94, 2007.

DENG, X.X.;, HO, N.W. Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the cloned xylulokinase gene. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 24-25, p. 193-199, 1990

DIEN, B.S., SARATH, G., PEDERSEN, J. F., SATTLER, S.E., CHEN, H., FUNNELL-HARRIS, D.L., NICHOLS, N.N., COTTA, M.A. Improved Sugar Conversion and Ethanol Yield for Forage Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) Lines with Reduced Lignin Contents. **Bioenerg. Res.**, v. 2, p.153–164, 2009.

DINIZ, G. M. M.. **Produção de Sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) Aspectos Gerais**. 2010. 23f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

DINIZ, J., CARDOSO, A. L., STAHL, J. A., VILLETTI, M. A., MARTINS, A. F. Poder calorífico da casca de arroz, caroço de pêssego, serragem de eucalipto e de seus produtos de pirólise. **Revista Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 25-32, 2004.

DIPAP - Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento Rural. **Aspectos gerais do cultivo do sorgo para o semiárido alagoano**. 2010. 5p. Disponível em: Acesso em: 18 dez. 2016.

EICHHORN, S. J., DUFRESNE, A., ARANGUREN, M., MARCOVICH, N. E., CAPADONA, J. R., ROWAN, S. J., 2010. Review: Current International research into cellulose nanofibres and nanocomposites. **Journal of Materials Science** 45, 1-33.

ELIASSON, A., CHRISTENSSON, C., WAHLBOM, C.; HAHN-HÄGERDAL, B. (2000). Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in Mineral Medium Chemostat Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, 66, 3381-3386.

EMBRAPA MILHO E SORGO. (2005). **Sistemas de Produção**, 2. Cultivo do sorgo – Plantio. ISSN 1679-012X. Versão Eletrônica - 4º ed. Set. 2008. Disponível em: Acesso em: 11 jun. 2016.

EMBRAPA MILHO E SORGO. **BRS508. O sorgo sacarino com alto teor de açúcar no caldo**. 2012. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/>

EMBRAPA. **Indicações de Aspectos Tecnológicos sobre o Bioetanol de Matéria-prima Amilácea**. 2009. Disponível em: <<http://www.cnptia.embrapa.br/content/09409-indicacoesde-aspectos-tecnologicos-sobre-bioetanol-de-materia-prima-amilacea.html> >. Acesso em: 12 de set. de 2016.

EMBRAPA. **Sorgo sacarino “a safrinha da cana-de-açúcar**. 2010. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/484735> >. Acesso em: 10 de set. de 2016

ERDEI, B.; HANCZ, D.; GALBE, M.; ZACCHI, G. SSF steam-pretreated wheat straw with the addition of saccharified or fermented wheat meal in integrated bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, p.1-14, 2013.

ERIKSSON, I. et al. Fiber swelling favoured by lignina softening. **Wood Science and Technology**, v. 25, p. 135-144, 1991.

FALKOSKI, D. L. et al. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 6, p. 1586–1603, 2012.

FAPESP. Diego Freire. **Brasil pode produzir 10 bi de litros de etanol de segunda geração até 2025**. 19 de abril de 2016. Acesso em: 29 Dez. 2016. Disponível em: http://agencia.fapesp.br/brasil_pode_produzir_10_bi_de_litros_de_etanol_de_segunda_geracao_ate_2025_diz_onu/23060/

FENGEL, D.; WEGENER, G., 1989. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**, Berlin/New York: Walter de Gruyter. 613p.

FERREIRA, L.L. **Isolamento e caracterização de leveduras fermentadoras de D-xilose e produtoras de xilanases associadas à madeira e bagaço de cana em decomposição**. 2010. 39f. Monografia (Graduação em Microbiologia), Instituição de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte, 2010.

FERREIRA, O.E. **Produção de etanol a partir de sorgo sacarino com tratamento enzimático**. Tese (doutorado em microbiologia Agropecuária). 2015. 79f. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015.

FIGUEIREDO, C.B.; FARIAS FILHO, J.R. Os impactos sociais dos biocombustíveis. In: **Congresso nacional de excelência em gestão**, 5. 2009. Niterói-RJ. Disponível em: <www.excelenciaemgestao.org>. Acesso em: 20 de novembro de 2015.

FONTES, M. M; SILVA, B. A; DANTAS, J.P; SILVEIRA, D. C; CAVALCANTI, M. T. Caracterização físico-químico do melado de sorgo granífero sacarino [*Sorghum bicolor* (L) Moench]. **Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil)** v.6, n.1, p. 216 – 219, 2011.

FORNASIERI FILHO, D.; FORNASIERI, J. L. **Manual da cultura do sorgo**. Jaboticabal: Funep, 2009.

FREITA, L. A, COSTA, G.H.G., MASSON, I. S., FERREIRA, O.E., MUTTON, M.A., & MUTTON, M.J.R.. Chemico-technological parameters and maturation curves of sweet sorghum genotypes for bioethanol production. **African Journal of Agricultural Research**, 9(50), 3638-3644, 2014.

FREITA, L. A. **Avaliação tecnológica e microbiológica da fermentação etanólica de caldo de sorgo sacarino**. 2013. 70f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2013.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulose activities. **Pure Appl. Chem.**, 59:257-268, 1987.

GIESE, E. et al. **Prospects for the bioethanol production from sugarcane feedstock: focus on Brazil**: Nova Science Publishers, New York, NY, USA 2011.

GOSHADROU A., KARIMI K., TAHERZADEH M. J. (2011) Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by *Mucor hiemalis*. **Industrial Crops and Products**, 34: 1219-1225.

HARGER, C.; SPRADA, D. ; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: **Bioquímica das Fermentações**, 56 p. 1982.

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

HORST, D. J. **Avaliação da produção energética a partir de ligninas contidas em biomassas**. Ponta Grossa: PR, 2013. Dissertação (mestrado), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013. 106 p.

ISONO, N.; HAYAKAWA, H.; USAMI, A.; MISHIMA, T.; HISAMATSU, M. A comparative study of ethanol production by *Issatchenkia orientalis* strains under stress conditions. **J. of Bioscience and Bioengineering**, v.113, n.1, p76-78, 2012.

JEFFRIES, T. W. (2006). Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, 17, 320-326.

JEFFRIES, T. W.; GRIGORIEV, I. V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J. M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; RICHARDSON, P. M. (2007). Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnology**, 25, 319-326.

JENKINS B.M.; BAKKER, R.R.; WEI, J.B. On the properties of washed straw. **Biomass and Bioenergy**; v.10 n. 4, p. 177-200, 1996.

JEOH, T. et al. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 1, p. 112-122, 2007.

JÓVÉR, J. Evaluation of sweet sorghum and sudangrass varieties by the viewpoint of bioethanol production. **Agrártudományi Közlemények**, v.59, p. 57-61, 2014.

KIM, S. R.; PARK, Y. C.; JIN, Y. S.; SEO, J.H. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. **Biotechnology Advances**, v.31, p. 851-861, 2013.

KLEMM, D. HEUBLEIN, B., FINK, H., BONH, A. 2005. CELLULOSE: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie-International**. edition44, 3358-3393.

LAIDLER, K.J. **Introduction to the Chemistry of Enzymes**. New York: McGraw-Hill Book Company Inc., 1954. 208 p.

LANDAU, E. C.; SANS, L. M. A. Clima. In: RODRIGUES, J. A.S. (Ed.). **Cultivo do sorgo**. 5. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de produção, Acesso em: 25 de set. de 2016.

LARSSON, P.T., WICKHOLM, K., IVERSEN, T.A CP/MAS ¹³C NMR investigation of molecular ordering in celluloses. *Carbohydr. Res.* 302: 19-25, 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, 2015, 839 p.

LI, J., LI, S., HAN, B., YU, M., LI, G., JIANG, Y. A novel cost-effective technology to convert sucrose and homocelluloses in sweet sorghum stalks into ethanol. **Biotechnology for Biofuels** v. 6:174-185, 2013.

LIAO, W.; LIU, Y.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. Studing the effects of reaction conditions on components of dairy manure and celulose accumulation using dilute acid treatment. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1992-1999, 2007.

LIISA, J. et al. Enzyme and Microbial Technology Cellulase – lignin interactions — The role of carbohydrate-binding module and pH in non-productive binding. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 5, p. 315–321, 2013.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIN, H.V. Produção de etanol. In: **Biotecnologia**. São Paulo: Editora. Edgar Blucher, 2001, v.3, p.1-43.

LODDER, J. **The yeasts**: a taxonomic study. Amsterdam: North Holland Publishing, 1970. 1385 p.

LORA, E.S.; ANDRADE, R.V. Biomass as energy source in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.13, p.777-788, 2009.

LOSORDO Z.; MCBRIDE J.; VAN ROOYEN, J.; WENGER, K.; WILLIES, D.; FROEHLICH, A.; MACEDO, I. C.; LYND, L. R.. Cost competitive second generation ethanol production from hemicellulose in a Brazilian sugarcane biorefinery. Online Library (wileyonlinelibrary.com); **Biofuels, Bioprod. Bioref.** 10:589–602. 2016.

MAEDA, R. N. et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* celulasas. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1196-1201, 2011.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Ecofisiologia da produção de sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa, 2003. (Comunicado técnico, 87).

MAGALHÃES, P. C.; DURAES, F.; SCHAFFERT, R. E. **Fisiologia da planta de sorgo**. Sete Lagoas (MG): Embrapa, 2000, 46 p. (EMBRAPA – CNPMS (CircularTécnica, 3).

MAGALHÃES, R. T.; GONÇALVES, L. C.; BORGES, I.; RODRIGUES, J. A. S.; FONSECA, J. F. Produção e composição bromatológica de vinte e cinco genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Arq. Bras. Med. Vet Zoo**, v, 62, p.747-751, 2010.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V. RIA M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, n. 1, p. 44–49, 2015.

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

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

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. 135f. Dissertação (Mestrado em Ciências Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

MARTINS, L.F. 2005. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulattum***. 121p. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

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. dos S. **Produção de bioetanol a partir da fermentação de caldo de sorgo sacarino e cana-de-açúcar**. 2013. 49f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2013.

MASSON, I. S; COSTA, G. H. G; ROVIERO, J.P; FREITA, L. A; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R. Produção de etanol a partir da fermentação de caldo de sorgo sacarino e cana-de-açúcar. **Cienc. Rural**, vol.45 no 9, Santa Maria, Sept. 2015.

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

MAW, M.J.W., HOUX III, J.H., FRITSCHI, F.B. Sweet sorghum ethanol yield component response to nitrogen fertilization. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 43-49, 2016.

MELANDER, C., BENGTSSON, M., SCHAGERLOF, H., TJERNELD, F., LAURELL, T. Y., GORTON, L. Investigation of micro-immobilised enzyme reactors containing endoglucanases for eficiente hydrolysis of cellodextrins and cellulose derivatives. **Analytica Chimica Acta**, 550: 182-190, 2005.

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

MONTANARI, R.; MARQUES JUNIOR, J.; CAMPOS, M. C. C.; SOUZA, Z. M.; CAMARGO, L. A. Caracterização mineralógica de Latossolos em diferentes feições do relevo na região de Jaboticabal, SP. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, p. 191-199, 2010.

MOON, R. J., MARTINI, A., NAIRN, J., SIMONSEN, J., YOUNGBLOOD, J., 2011. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews** 40, 3941-3994.

MOONEY, C. A. et al. The effect of initial pore volume and lignina contente on the enzymatic hydrolysis of softwood. **Bioresource technology**, v. 64, p. 113-119, 1998.

MORO, Mariana Kuster. **Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar por extrusão com dupla-rosca**. 2015. 119f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., 2005, "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass". **Bioresource Technology**, v.96, pp. 673-686.

MURRAY, S. C.; SHARM, A.; ROONEY, W. L.; KLEIN, P. E.; MULLET, J. E.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S. Genetic Improvement of Sorghum as a Biofuel Feedstock: I. QTL for Stem Sugar and Grain Nonstructural Carbohydrates. **Crop Science**, Madison, v. 48, p. 2165-2179, 2008.

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

NAKAJIMA, M. et al. Identification, cloning, and characterization of b-glucosidase from *Ustilago esculenta*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 1989–1998, 2012.

NAKASU, P. Y. S. et al. Acid post-hydrolysis of xylooligosaccharides from hydrothermal Monografia de TCC – Química – Bacharelado – UFSJ - 2016 21 pretreatment for pentose ethanol production. **Fuel**, v. 185, p. 73–84, 2016.

NAKATANI, T. et al. Micropore structure of wood: change in micropore structure accompanied by delignification. **Journal of Wood Science**, v.54, p. 252-255, 2008.

NEUMANN, M.; RESTLE, J.; ALVES FILHO, D. C.; BERNARDES, R. A. C.; ARBOITE, M. Z.; CERDOTESE, L.; PEIXOTO, L. A. de O. Avaliação de diferentes híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor*, L. Moench) quanto aos componentes da planta

e silagens produzidas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.31, n.1, p.302-312, 2002

O'SULLIVAN, A.C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, 4:171-207, 1997.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática De Biomassa: revisão. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

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

OKSMAN e SAIN (ed); SAIN, M. (ed), 2005. Cellulose Nanocomposites, Processing, Characterization and Properties, **ACS symposium series**, 938.

OLIVEIRA, M. C. F.; PAGNOCCA, F. C. Aplicabilidade de meios seletivos empregados nas indústrias de cervejarias à detecção de leveduras selvagens em unidades sucroalcoleiras. In: **SINAFERM**, 7. 1988, São Lourenço. Anais. São Lourenço, MG. 1988. p. 78-81.

OLIVEIRA, R. de P.; FRANÇA, A. F. de S.; RODRIGUES FILHO, O.; OLIVEIRA, E. R. de; ROSA, B.; SOARES, T. V.; MELLO, S. Características agronômicas de cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) sob três doses de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 1, p. 45-53, 2005.

PACHECO, T.F. **Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? Circular técnica 4**. Embrapa. Brasília, 1ª ed., n. 1, p. 1-6. ISSN 2177-4420. 2011.

PACHECO, T.F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia. 2011.

PADUKONE, N. (1996). Advanced process options for bioethanol production. In: **Handbook on bioethanol production and utilization**. Wyman C. F. (Ed.), Taylor & Francis, Bristol, 315-323.

PAGNOCCA, F.C. **A busca por mais etanol**. Disponível na internet em: <http://www.rc.unesp.br/ib/ceis/mundoleveduras/2012/A%20busca%20por%20mais%20etanol.pdf>. Consulta em 20 de janeiro de 2017.

PALMQVIST, E, HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technol.**, 74, 25-33, 2000.

PARRELLA, R. A. C; MENEGUCI, J. L. P; RIBEIRO, A; SILVA, A. R; PARRELLA, N. L. D; RODRIGUES, J. A; TARDIN, F.D; SCHAFFERT, R. E. **Desempenho de cultivares de sorgo sacarino em diferentes ambientes visando à produção de etanol**. Resumos expandidos. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2010. Goiânia.

PASTORE, T.C.M. (2004). **Estudos do efeito da radiação ultravioleta em madeiras por espectroscopias Raman (Ft-Raman), de reflectância difusa do infravermelho (DRIFT) e no visível (CIEL-L*a*b)**. 117p. Tese (Doutorado). Instituto de Química Universidade de Brasília. 2004.

PAULA, L.E.R., TRUGILHO, P.F., NAPOLI, A., BIANCHI, M.L. Characterization of Residues from Plant Biomass for Use in Energy Generation. **Cerne**, v.17, N. 2 p., 237-246, 2011.

PEREIRA FILHO, I. A.; PARRELLA, R. A. C.; MOEREIRA, J. A. A.; MAY, A., SOUZA, V. F., CRUZ, J. C. **Avaliação de Cultivares de Sorgo Sacarino [*Shorgum bicolor* (L.) Moench] em Diferentes Densidades de Semeadura Visando à Obtenção de Etanol**. Resumos expandidos. In: XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2012. Águas de Lindóia.

PÉREZ, A. F. H.; ARRUDA P. V. de, FELIPE, M. das G. de A. **Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037**. Brazilian Journal of Microbiology. 47, 489-496. 2016.

PETERSEN; M.O; LARSEN, J.; THONSEM, M.H. Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition chemicals. **Biomass and Bioenergy**, v.33 p.834-840, 2009.

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.

PIVETTA, Raul Sobrinho. **Acúmulo de matéria seca e nutrientes de híbridos de sorgo sacarino em condições de safrinha em Selvíria-MS**. Dissertação (mestrado). 2014. 51 p. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2014.

PRADO, R. M. **Manual de nutrição de plantas forrageiras**. Jaboticabal, 2008. FUNEP. 413p.

PROMPT, A. H. **Análise da fermentação de glicose e xilose por leveduras *Spathaspora* isoladas de madeira em decomposição**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. 2012. 84p.

QUILHÓ, F. T. L. **Produção de Etanol a partir de Materiais Lenho-celulósicos de Sorgo Sacarino: Revisão Bibliográfica**. 2011. 88 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2011.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 447f, 2010. Tese (Doutorado em Engenharia Química).

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2010.

RAMIRES, E.C., Dufresne, A., 2011. **A Review of Cellulose Nanocrystals and Nanocomposites**, Tappi J. 9-15.

REIS, Alexandre Libanio Silva. **Perfil fermentativo de uma linhagem de Dekkera bruxellensis van der Walt (1964) a partir de hidrolisados lignocelulósicos e suas implicações na produção de etanol de segunda geração**. Tese (Doutorado). 2014. 94 p. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2014.

REN21, Key Findings. **Global Status Report REN**, Paris, pp.1–33, 2015.

Renzo Garcia Von Pinho, Ramon Correia de Vasconcelos.-Lavras: editora UFLA/FAEPE, 2002. 76p.: il. – (texto acadêmico)

RIBAS, P. M. Importância econômica. EMBRAPA MILHO E SORGO, 2008. Disponível em:<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fonteshtml/sorgo/cultivosdosorgo_2ed/importancia.htm> Acesso em: 14 de novembro de 2016.

RICHARD, P., TOIVARI, M. H.; PENTTILÄ, M. (2000). The role of xylulokinase in *Saccharomyces cerevisiae* xylulose catabolism. **FEMS Microbiology Letters**, 190, 39-43.

ROCHA, G. J. M.; MARTÍN, C.; SILVA, V. F. N.; GÓMEZ, E. O.; GONÇALVES, A. R. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v.111, p. 477-452, 2012.

ROCHA, G. J. M.; NASCIMENTO, V. M.; SILVA, V. F. N. Da; CORSO, D. L. S.; GONÇALVES, A. R. Contributing to the environmental sustainability of the second generation ethanol production: Delignification of sugarcane bagasse with sodium

hydroxide recycling. **Industrial Crops and Products**, 2014, 59, 63. [CrossRef] 43 Li, Y.; Zhang, Y.; Zh

RODRIGUES, J.A.R. Do engenho á biorrefinaria. A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, v. 34, p. 1242-1254, 2011.

ROSAS, J. Curso de Biología Molecular Y Celular. **Enzimas: Aceleradores de las Reacciones Químicas de los Seres Vivos**. 2003. Disponível em: <<http://interbiologia.virtualave.net>> Acesso em 20 set 2016.

ROSSELL, C. E. V et al. Saccharification of sugarcane bagasse for ethanol production using the organosolv process. **Sugar Industry/ Zuckerindustrie** 131, 2006.

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 76, p. 65-77, 1999.

SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; Wu, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v.4, p. 3693-3700, 2005.

SANTOS, Flávia Cristina dos; ALBUQUERQUE FILHO, Manoel Ricardo de; RESENDE, Álvaro Vilela de; OLIVEIRA, Antônio Carlos de; OLIVEIRA, Marcele Silva e GOMES Talita Camargos. Adubação nitrogenada e potássica na nutrição e na extração de macronutrientes pelo sorgo biomassa. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.14, n.1, p. 10-22, 2015.

SANTOS, R.M.Dos. **Extração e Caracterização de Nanocristais de celulose a partir de folhas de abacaxi**. Dissertação (mestrado). 2013. 80 p. Universidade Federal de Uberlândia, 2013.

SANTOS, T.N.; **Avaliação da biomassa de sorgo sacarino e palma forrageira para produção de etanol em Pernambuco**. 2012. 95 p. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

SEWALT, V., GLASSER, W., BEAUCHEMIN, K. Lignin impact on fiber degradation III: reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignina and by additives. **J. Agri Food Chem**, 45:1823-1828, 1997.

SHARMA, S.; SHARMA, V.; KUILA, A. Cellulase production using natural medium and its application on enzymatic hydrolysis of thermo chemically pretreated biomass. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 139, 2016.

SILVA, A. S., TEIXEIRA, R. S., MOUTTA, R. O., FERREIRA-LEITÃO, V. S., BARROS, R. R. O., FERRARA, M. A., BON, E. P. S., 2013, "Sugarcane and Woody Biomass Pretreatments for Ethanol Production". In: Chandel, A. K., Silva, S. S. (eds), **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass – Techniques, Applications and Commercialization**, 1 ed., chapter 3, Rijeka, Croatia, Intech.

SILVA, D.M.; MUSIAL, D.C; ALTMAYER, C.; VALENTINI, S.A. Obtenção de derivado de celulose a partir do bagaço de cana-de-açúcar com potencial aplicação nas indústrias farmacêuticas e cosmética. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v.32, n.1, p. 41-45, 2011.

SILVA, O. de O. **Aproveitamento do bagaço de abacaxi (Ananas comosus L. Merrill) para produção biotecnológica de xilitol**. 142 f. 2011. Tese (Doctor Scientiae em ciência e tecnologia de alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

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

SILVA, V. F. N. **Avaliação de parâmetros experimentais do fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar na obtenção de etanol celulósico e lignina**. 2014. 145 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2014.

SINGHA, J., SUHAG, M., DHAKAC, A. 2015. "Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review", **Carbohydrate Polymers**. v. 117, pp. 624–631.

SLUITER JB, CHUM H, GOMES AC, TAVARES RAP, AZEVEDO V, PIMENTA MTB, ET AL. **Evaluation of brazilian sugarcane bagasse characterization: an interlaboratory comparison study**. J AOAC Int 2016;99(3):579–85.

SORENSEN, T. H. et al. Temperature effects on kinetic parameters and substrate affinity of Cel7A cellobiohydrolases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 36, p. 22193–22202, 2015.

SOUZA, V. F.; **Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de sorgo sacarino**. 2011. 63 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba – MG, 2011.

SUN, Y., CHENG, J., 2002. "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review". **Bioresource Technology**, v.83, pp. 1–11.

SZCZODRAK, J., FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, 10(5/6):367-375, 1996.

TABKA, M.G.; HERPOEL-GIMBERT, I.; MONOD, F.; ASTHER, M.; SIGOILLOT, J.C. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulose xylanase and feruloyl esterase treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p.897-902, 2006.

TEIXEIRA, A.M. et al. Intake and digestibility of sorghum (*Sorghum bicolor*, L. Moench) silages with diferente tannin contentes in sheep. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 43, n.1, p.14-19, 2014.

TENKANEN, M., NIKU-PAAVOLA, M.L.; LINDER, M.; VIKARI, L. cellulase in food processing. In: **handbook of food enzymology**. NEW YORK. P 879-915.2003.

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.

TUCKER, M. P.; KIM, K.H.; NEWMAN, M. M; NGUYEN, Q. A. Effects of temperature and moisture on dilute-acid steam explosion pretreatment of corn stover and cellulose enzyme digestibility. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 165-177, 2003.

UNCTAD (2016). **Second generation biofuel markets: state of play, trade and developing country perspectives**. UNCTAD/DICT/TED/2015/8.

VAN DER WALT, J. P.; YARROW, D. Methodos for isolation maintenance, classification and identification of yeasts. In: KREGGER-VAN RIJ, N. J. W. (Ed.) **The Yeasts: a taxonomy study**. 3. ed. Amesterdam: Elsevier Science Publishing, 1984. cap. 2, p. 45-104.

VARIZ, D.I.L.S. **Avaliação da biomassa de sorgo forrageiro para produção biotecnológica de xilitol**. 2011. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2011.

VIEIRA, Gustavo Ferraz de Arruda. **Variabilidade espacial de atributos químicos do solo sob pastagem em um sistema de produção de bovinos de corte**. 2014. 152 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Zootecnia. APTA/SAA, Nova Odessa.

VISSER, E. M. et al. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 587–594, 2013.

WYMAN, C. E. Twenty years of trials, tribulations and research progress in bioethanol technology - Selected key events along the way. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 91-3, 5-21, 2001.

XU, F.; SHI, Y.-C.; WU, X.; Theerarattananon, K.; Staggenborg, S.; Wang, D. Sulfuric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of photoperiod sensitive sorghum for ethanol production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2010.

YANG, B. et al. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v.2, n.4, p.421-450, 2011.

ZAMORA, F. (2009). Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In: V. Moreno-Arribas, & C. Polo (Eds.), **Wine Chemistry and Biochemistry** (Vol. Capítulo 1, pp. 3-26).

ZHOU, Z. et al. Kraft GL-ethanol pretreatment on sugarcane bagasse for effective enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 90, p. 100–109, 2016.

Apêndices

Apêndice I – Determinação de Extrativos

Para prevenir eventuais interferências na determinação da composição química do bagaço, faz-se necessário remover materiais não-estruturais antes de tais análises. Este procedimento usa um processo de extração em duas etapas para remover materiais solúveis em água e em uma mistura etanol/cicloexano. Materiais solúveis em água podem incluir materiais inorgânicos, açúcares não-estruturais, materiais nitrogenados, entre outros. Materiais inorgânicos solúveis em água podem vir da própria biomassa ou quaisquer outros materiais solúveis que estão associados à biomassa como solo ou fertilizantes. Materiais solúveis em solventes orgânicos incluem clorofilas, ceras ou outros componentes minoritários (NAKASU, 2015).

1) Objetivo

Remoção de materiais solúveis em água e em cicloexano/etanol a quente.

2) Equipamentos e materiais

- Balança analítica com precisão de 0,1 mg.
- Balança de umidade, marca *Sartorius*, modelo MA35.
- Aparatos para extração com Soxhlet:
 - Tubos de extração de vidro Soxhlet de 85 mL.
 - Mantas aquecedoras próprias para balões de fundo redondo de 500 mL.
 - Condensadores adequados aos tubos Soxhlet e uma fonte de água fria.
 - Mangueiras de látex.
 - Suporte universal.
 - Balões de fundo redondo de 500 mL, junta 24/40.

- Pedrinhas de porcelana.
- Papéis de filtro cortados em círculos (raio de 9 cm) de porosidade média.
 - Cadinhos de vidro de porosidade nº3
 - Kitassato.
 - Proveta de 500 mL.
 - Funil de vidro.
 - Dessecador com material dessecante (sílica-gel).

3) Reagentes

- Água destilada.
- Etanol absoluto 92,8°INPE.
- Cicloexano.

4) Procedimento Experimental

- 4.1) Montaram-se cartuchos de papel de filtro devidamente identificados.
- 4.2) Pesaram-se cerca de 5 gramas de bagaço previamente moído (e cujo teor de umidade foi determinado) nos cartuchos. Anotou-se a massa.
- 4.3) Transferiram-se os cartuchos com bagaço para os tubos de Soxhlet e montou-se a aparelhagem de extração conforme a Figura 84 abaixo:



Figura 73. Primeira etapa da extração.

Transferiram-se 200 mL de etanol e 200 mL de cicloexano para o balão de fundo redondo com pedrinhas de porcelana previamente adicionadas. Ajustou-se a temperatura da manta aquecedora para ocorrerem cerca de 4-5 ciclos de sifonação por hora após a ocorrência do primeiro ciclo. Refluxou-se por cerca de oito horas.

4.5) Segunda Etapa da Extração

Transferiram-se 400 mL de água destilada para um novo balão de fundo redondo com pedrinhas de porcelana previamente adicionadas. Ajustou-se a temperatura da manta aquecedora para ocorrer cerca de 4 - 5 ciclos de sifonação por hora após a realização do primeiro ciclo. Refluxou-se por cerca de oito horas. Repetiu-se esta etapa de extração por mais duas vezes.

4.6) Transferiu-se quantitativamente o material extraído dos cartuchos para cadinhos de vidro previamente secos e tarados.

4.7) Levaram-se os cadinhos para estufa para secarem até massa constante a 105 °C. Transferiram-se os cadinhos da estufa direto para um dessecador. Após resfriados, anotou-se a massa dos cadinhos com precisão de 0,1 mg.

5) Cálculos

Cálculo da Massa em Base Seca da amostra (MBS):

$$MBS = \frac{(\text{Cartucho}_{\text{com amostra}} - \text{Cartucho}_{\text{vazio}}) \times \% \text{ Sólidos Totais}}{100}$$

Cálculo do teor de extrativos:

$$\% \text{ Teor de Extrativos} = \frac{(\text{Amostra}_{\text{com extrativos}} - \text{Amostra}_{\text{sem extrativos}}) \times 100}{\text{MBS}_{\text{amostra}}}$$

6) Referências Bibliográficas

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.. TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass, LAP | Laboratory Analytical Procedure, NREL, 2005.

Apêndice II

A quantidade de material inorgânico no bagaço, tanto estrutural quanto não estrutural, pode ser medida como parte da composição total. Cinzas estruturais são materiais inorgânicos que estão fisicamente ligados á estrutura da biomassa, enquanto cinzas não-estruturais são materiais inorgânicos que podem ser removidos por lavagem ou extração do material. Cinzas não-estruturais podem ser resultado de solo remanescente na biomassa.

1) Objetivo

Determinação do teor de cinzas totais (estruturais e não-estruturais) no bagaço de sorgo.

2) Equipamentos

- Forno de mufla equipada com um termostato.
- Balança analítica com precisão de 0,1 mg.
- Dessecador com agente dessecante (sílica gel).
- Cadinhos de porcelana de 50 mL devidamente identificados.
- Balança de umidade, marca *Sartorius*, modelo MA35.

3) Procedimento experimental

3.1) Deixaram-se os cadinhos de porcelana na mufla a 575 ± 25 °C por um período mínimo de quatro horas. Transferir os cadinhos da mufla diretamente para um dessecador. Pesaram-se os cadinhos após resfriados.

3.2) Pesaram-se 2,0 g com precisão de 0,1 mg de bagaço devidamente moído em um cadinho previamente tarado. Anotaram-se as massas das amostras. Determinaram-se as umidades do bagaço de acordo com item 7.

3.3) Aqueceram-se as amostras em mufla com a seguinte rampa de temperatura:

- Temperatura de 105°C por 18 minutos;
- Rampa de 10°C .min⁻¹ até 250°C;
- Temperatura de 250°C por 37 minutos;
- Rampa de a 20°C .min⁻¹ até 575°C;
- Temperatura de 575°C por 200 minutos.

3.4) Retiraram-se os cadinhos da mufla diretamente para um dessecador e resfriaram-se-os.

Pesaram-se os cadinhos com as cinzas com precisão de 0,1 mg e anotou-se massa.

4) Cálculo do teor de cinzas

$$\% \text{Cinzas} = \frac{m_{\text{cinzas}}}{m_{\text{amostra seca}}} \times 100$$

5) Referências Bibliográficas

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.. TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass, LAP | Laboratory Analytical Procedure, NREL, 2005.

Apêndice III- Determinação de lignina

Lignina e carboidratos perfazem a parte majoritária de amostras de bagaço. Esses constituintes devem ser quantificados como parte de uma vasta série de análises da biomassa.

Carboidratos podem ser estruturais ou não-estruturais. Carboidratos estruturais estão ligados á matriz da biomassa, enquanto carboidratos não-estruturais podem ser removidos por etapas de lavagem ou extração com solvente. Lignina é uma macromolécula complexa (NAKASU, 2015). Este procedimento utiliza uma hidrólise em duas etapas para fracionar a biomassa em formas que são mais facilmente quantificáveis. A lignina é fracionada em uma porção solúvel e outra insolúvel em ácido mineral. O material insolúvel em ácido inclui também cinzas e proteínas, os quais devem ser levados em conta na análise gravimétrica (determinação de cinzas estruturais). A lignina solúvel em ácido é quantificada por espectroscopia UV-Vis. Durante a hidrólise, os carboidratos poliméricos são hidrolisados a formas monoméricas, as quais são solúveis no licor de hidrólise. Eles então são quantificados por CLAE.

1) Objetivo

Quantificação de lignina e carboidratos estruturais de bagaço livre de extrativos.

2) Equipamentos e materiais

- Balança analítica com precisão de 0,1 mg.
- Balança de umidade, marca *Sartorius*, modelo MA35.
- Forno de mufla equipado com termostato.
- Banho termostaticado, marca FANEM, modelo 1100, programado a $30\pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Autoclave programada a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Instalação de filtração equipada com bomba de vácuo e adaptadores de vácuo para funis de vidro sinterizado.
- Dessecador contendo agente dessecante (sílica gel).

- Bureta automática, marca Metrohm, modelo 876 *Dosimat Plus*.
- Dispensador marca *Brand*, modelo *Dispensette*.

Espectrômetro UV-Vis, marca ThermoScientific, modelo *Evolution 300*.

. Cromatógrafo CLAE Agilent, modelo 1260 *Infinity* com detecção por índice de refração. E as seguintes colunas:

- Aminex HPX-87H 300 mm x 1,00 UM 7,8 mm x 9um, Bio-rad com coluna de guarda *Micro-Guard Cation PC H Refill Cartridges* Bio-rad.
- C18 - 150 mm x 4,6 mm x 3 mm.

- Tubos de pressão de vidro, capacidade mínima de 90 ml com tampa rosqueável de teflon.
- Funis de vidro sinterizado porosidade .N^o4.
- Erlenmeyers, 250 mL.
- Kitassatos.
- Micropipetas.
- Cadinhos de porcelana.
- Tubos falcon, 50 mL.

3) Reagentes

- Ácido sulfúrico 72% m/m (massa específica 1,6338 g . mL⁻¹ a 20°C)
- Carbonato de cálcio, reagente grau ACS.
- Solução de NaOH 5,0 mol L⁻¹.
- Água destilada, filtrada com filtro de poro de diâmetro médio 0,2 µm.
- Padrões de alta pureza: D-celobiose, D(+)-glicose, D(+)-xilose , D(+)-arabinose, HMF, furfural e ácido acético.

4) Procedimento Experimental

4.1) Preparo das amostras para análise e hidrólise

4.1.1) Transferiu-se um número apropriado de cadinhos de porcelana para a mufla a 575 ± 25 °C por um período mínimo de quatro horas. Após esse período, transferiram-se os cadinhos diretamente para um dessecador. Após resfriados, tiveram suas massas determinadas com precisão de 0,1 mg.

4.1.2) Pesaram-se $300,0 \pm 10,0$ mg das amostras de bagaço pré-extraído (mbagaço pré-extraído) em tubos de pressão tarados. Anotou-se a massa e cada tubo foi identificado com adesivos. As amostras tiveram teor de umidade determinado em balança de umidade. Cada amostra foi analisada em duplicata.

4.1.3) Adicionaram-se $2,00 \pm 0,01$ mL de ácido sulfúrico 75% a cada tubo de pressão. Usou-se um bastão de teflon para agitar a mistura por 1 minuto ou até que a amostra estivesse completamente misturada.

4.1.4) Transferiram-se os tubos de pressão ao banho termostaticado a 30 ± 3 °C e incubaram-se as amostras por cerca de 60 minutos . Utilizou-se o bastão de teflon para agitar as amostras a cada 5 a 10 minutos sem que fossem retiradas do banho. A agitação é essencial para garantir que todas as partículas entrem em contato com o ácido tornando o processo de hidrólise homogêneo.

4.1.5) Após 60 minutos de hidrólise, os tubos foram removidos do banho térmico. A solução final foi diluída para uma concentração de 4% (m/m), mediante a adição de $84,00 \pm 0,04$ ml de água deionizada usando uma bureta automática. Os tubos foram fechados e homogeneizados.

4.1.6) Transferiram-se os tubos para autoclave. As amostras mantiveram-se seladas por uma hora a 121 °C na autoclave. Depois de finalizado o ciclo da autoclave, deixou-se o hidrolisado resfriar á temperatura ambiente antes de se abrir os tubos.

4.2) Análise da amostra para lignina insolúvel

4.2.1) As soluções de hidrólise autoclavadas foram filtradas a vácuo através de funis de vidro sinterizados previamente tarados.

4.2.2) Transferiu-se uma alíquota de aproximadamente 50 mL para um tubo falcon. Essa amostra será utilizada na determinação da lignina solúvel em ácido assim como carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e HMF. A determinação da lignina solúvel em ácido deve ser feita dentro de seis horas após a hidrólise.

4.2.5) Transferiram-se os funis para uma mufla com a seguinte rampa de temperatura:

- Temperatura de 105°C por 12 min;
- Rampa de 10°C · min⁻¹ até 250°C;
- Temperatura de 250°C por 30 minutos;
- Rampa de a 20°C · min⁻¹ até 575°C;
- Temperatura de 575°C por 180 min.

4.2.6) Retiraram-se os funis cuidadosamente da mufla e estes foram transferidos para a estufa, sendo mantido por aproximadamente 12 horas. Após este período, os cadinhos foram transferidos para um dessecador. Após um período de 6 horas, os cadinhos tiveram sua massa determinada com precisão de 0,1 mg.

4.2.7) Cálculo da lignina insolúvel

Teor de lignina insolúvel para o bagaço in natura:

$$\text{Lignina Insolúvel(\%)} = \left(\frac{m_{\text{lignina insolúvel}} - m_{\text{cinzas}}}{m_{\text{amostra seca pré-extraída}}} \right) \times \left[1 - \left(\frac{\% \text{ extrativos}}{100} \right) \right]$$

Teor de lignina insolúvel para as celuligninas:

$$\text{Lignina Insolúvel(\%)} = \left(\frac{m_{\text{lignina insolúvel}} - m_{\text{cinzas}}}{m_{\text{amostra seca pré-extraída}}} \right) \times 100$$

4.3) Análise da lignina solúvel em ácido

4.3.1) No espectrômetro UV-Visível, correu-se um branco de ácido sulfúrico 3% em água deionizada.

4.3.2) Utilizando uma alíquota do licor de hidrólise da etapa, a amostra foi diluída, o quanto necessário, e teve o pH do meio ajustado para 12. Esta etapa é imprescindível para garantir que toda a lignina esteja solubilizada. A absorbância da amostra foi determinada a 280 nm.

4.3.3) Cálculo da lignina solúvel

$$C_{\text{lignina solúvel}} = 4,187 \times 10^{-2} (A_T - A_{PD}) - 3,279 \times 10^{-4}$$

Onde: $C_{\text{lignina solúvel}}$ - concentração de lignina solúvel, em g. L⁻¹; A_T - absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm; $A_{PD} = c_1\epsilon_1 + c_2\epsilon_2$ - absorbância dos produtos de degradação de açúcares em 280 nm (furfural e HMF), cujas concentrações foram determinadas previamente por CLAE e ϵ_1 e ϵ_2 são as absorvidades molares do furfural e HMF que valem 146,85 e 114,00 L g⁻¹ · cm⁻¹.

5) Referências Bibliográficas:

LUITER, A.; HAMES, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D, CROOKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, LAP- **Laboratory Analytical Procedure**, NREL, 2008.

ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T.; CURVELO, A. A. S.; ARA_UJO, G. T. **Resumos do 5th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components**, Paraná, Brasil.