UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MOSTO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PONTA E PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Juliana Pelegrini Roviero

Tecnóloga em Biocombustíveis

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MOSTO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PONTA E PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Juliana Pelegrini Roviero

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

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

2013

Roviero, Juliana Pelegrini
R875p Produção de etanol a partir de mosto hidrolisado hemicelulósico de ponta e palha de cana-de-açúcar / Juliana Pelegrini Roviero. – – Jaboticabal, 2013
vi, 71p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Márcia Justino Rossini Mutton
Banca examinadora: Flávia Cecílio Ribeiro, Clóvis Parazzi

Bibliografia

1. Fermentação etanólica. 2. Biomassa vegetal. 3. Xilose. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.52:633.61

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

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MOSTO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PONTA E PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

AUTORA: JULIANA PELEGRINI ROVIERO

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON

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

Profa. Dra. MARCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. FLÁVIA CECÍLIO RIBEIRO
Fundação Educacional de Guaxupé / Guaxupé/MG

Prof. Dr. CLÓVIS PARAZZI
Universidade Federal de São Carlos / Araras/SP

Data da realização: 22 de fevereiro de 2013.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

JULIANA PELEGRINI ROVIERO – nasceu aos 25 de Novembro de 1988, na cidade de Jaboticabal, estado de São Paulo. Em Fevereiro de 2008 ingressou no curso de Tecnologia em Biocombustíveis na Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, recebendo o título Tecnóloga em Biocombustíveis em Dezembro de 2010. A partir de 2008 passou a integrar o grupo de pesquisas de Processos Biotecnológicos Aplicados á Agroindústria do Laboratório de Tecnologia em açúcar e álcool, participando do desenvolvimento diversos projetos. Em março de 2011 ingressou no curso em nível de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária) da FCAV – UNESP obtendo o título de mestre em fevereiro de 2013.

Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais

Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz

Almir Sater e Renato Teixeira

A minha família, em especial a minha mãe Angela,

pela confiança, paciência, pelo exemplo,

pelo apoio, pela vida!

Sem ela eu não teria conseguido chegar até aqui.

DEDICO

A Profª Márcia Mutton,, pelo conhecimento, pela oportunidade, por acreditar em mim.

Ao Prof. Miguel Mutton por sua imensa contribuição, e pelas palavras que sempre nos passam tranquilidade.

OFEREÇO

AGRADEÇO

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

Ao Prof. Dr. Miguel Mutton que sempre aparece com um sorriso no rosto para nos passar tranquilidade, porque no fim da tudo certo.

A banca examinadora, pela disponibilidade e pela imensa contribuição.

Á FCAV/UNESP Jaboticabal, principalmente ao curso de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, e a CAPES pela bolsa que formam a base para que essa pesquisa fosse desenvolvida.

A Usina Santa Adélia e a Copercana pelo material cedido, e pela ajuda em seu preparo.

À equipe da Profa. Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe, na pessoa da Dra. Priscila Vaz de Arruda EEL/USP, que colaboraram em grande parte do experimento.

Ao pessoal do Lab. TAA: Sérgio, Gustavo, Igor, Lidy, Juliana, Larissa, Osania, Marcel, Aline, Nayara, Jorge, Marcelo, Nayara S., Vitor, Fernanda, Rita, Silvia, Cristhyane pela sincera amizade.

Aos meus amigos Gustavo, Igor e Lidy que não só no laboratório, fazem toda a diferença.

A Daniele, pela nossa amizade. Nossos momentos juntas nesse tempo serão recordados com muito carinho e sempre com imensas saudades.

Ao Antonio de Andrade, um grande amigo que esteve presente em todos os momentos dessa jornada.

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

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

OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS iii

LISTA DE QUADROS E TABELAS 6

1. INTRODUÇÃO 10

2. REVISÃO DE LITERATURA 12

2.1. Biocombustíveis e o futuro 12

2.2. Cana-de-açúcar 13

2.3. Matériais lignocelulósicos 14

2.3.1.Palha de cana-de-açúcar 15

2.3.2. Ponteiros de cana-de-açúcar 16

2.4. Obtenção de açúcares a partir da hidrólise ácida de resíduos lignocelulósicos ... 16

2.5.Metabolismo de glicose, xilose e arabinose para produção de etanol 17

2.6.Leveduras metabolizadoras de xilose. 18

2.7.Cocultura de leveduras 19

2.8. Conversão de biomassa a etanol 20

2.9. Compostos inibidores. 21

3. MATERIAL E MÉTODOS 24

3.1. Delineamento experimental 24

3.2. Matéria-prima 24

3.3. Hidrólise e concentração do hidrolisado hemicelulósico da palha e ponteiros de cana. 25

3.4. Determinação da composição da palha e ponteiros de cana-de-açúcar 26

3.5. Destoxificação do hidrolisado da palha e ponteiros e clarificação do caldo de cana 26

3.6. Análises tecnológicas 27

3.7. Determinação da concentração de fenóis totais no hidrolisado 28

3.8. Microrganismos fermentadores 28

3.9.Crescimento de massa celular 29

3.10. Tratamentos 29

3.11. Condução das fermentações 30

3.12. Microbiologia das fermentações 30

3.13. Determinação das concentrações de monossacarídeos totais, ácido acético, produção de etanol e xilitol durante a fermentação. 30

3.14. Determinação de glicerol 31

3.15. Análise Estatística 31

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 32

4.1. Composição do material lignocelulósico 32

4.3. Viabilidade Celular 35

4.4. Metabolismo de açúcares 43

4.5. Processo fermentativo 47

5. CONCLUSÕES 59

6. REFERÊNCIAS 60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma da via de obtenção de xilitol e etanol a partir dos açúcares glicose, xilose e arabinose. 17

Figura 2. Amostra de Palha e ponteiros de cana-de-açúcar antes de serem triturados e secos em estufa, Jaboticabal, 2012. 25

Figura 3. Processo de destoxificação do hidrolisado da fração hemicelulósica do material..... 27

Figura 4. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para viabilidade celular (%) do mosto de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2012. 38

Figura 5. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para viabilidade celular da levedura (%) J10, FT858 e a mistura da J10 com FT858. Jaboticabal-SP, 2012. 39

Figura 6. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para brotamentos (%) do mosto de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2012..... 40

Figura 7. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para viabilidade de brotos (%) do mosto de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2012. 41

Figura 8. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para viabilidade de brotos (%) das leveduras J10, FT858 e a mistura da J10 com FT858. Jaboticabal-SP, 2012..... 42

Figura 9. Resultados médios do consumo de açúcares totais para os mostos e leveduras ao longo de 72 horas de fermentação. Jaboticabal-SP, 2012. 43

Figura 10. Representação gráfica da regressão polinomial para glicose (g/L) nos mostos de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2013. 44

Figura 11. Representação gráfica da regressão polinomial para glicose (g/L) nas leveduras J10, FT858 e a mistura da J10 com FT858. Jaboticabal-SP, 2013. 45

Figura 12. Resultados médios do consumo de xilose no mosto de hidrolisado hemicelulósico para os inóculos avaliadosao longo de 72 horas de fermentação, Jaboticabal-SP, 2012..... 46

Figura 13. Resultados médios do consumo de arabinose no mosto de hidrolisado para os inóculos avaliados hemicelulósico ao longo de 72 horas de fermentação, Jaboticabal-SP, 2012..... 47

Figura 14. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para Brix (%) nos mostos de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2012..... 49

Figura 15. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para pH nos mostos de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2012. 50

Figura 16 Representação gráfica da regressão polinomial calculada para ácido acético no vinho (g/L) nos mostos de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2012. 53

Figura 17. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para xilitol no vinho (g/L) nos mostos de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2012.....54

Figura 18. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para xilitol no vinho (g/L) nas leveduras J10, FT858 e a mistura da J10 com FT858. Jaboticabal-SP, 2012. 55

Figura 19. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para etanol no vinho (g/L) nos mostos de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2012.....56

Figura 20. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para etanol no vinho (g/L) nas leveduras J10, FT858 e a mistura da J10 com FT858. Jaboticabal-SP, 2012. 57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Resultados obtidos para Celulose, Hemicelulose, Lignina e Energia Bruta em (%) da ponta e palha de cana-de-açúcar antes e após hidrólise da fração hemicelulósica, Jaboticabal-SP, 2012.....32

Quadro 2. Resultados médios obtidos para as análises tecnológicas do caldo de cana, hidrolisado hemicelulósico de ponta e palha de cana-de-açúcar e hidrolisado hemicelulósico concentrado, Jaboticabal-SP, 2012. 33

Quadro 3. Resultados médios obtidos para as análises tecnológicas dos mostos a partir de caldo de cana, hidrolisado hemicelulósico de ponta e palha de cana-de-açúcar e a mistura de ambos, Jaboticabal-SP, 2012. 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados médios obtidos para da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para as análises microbiológicas, empregando-se mostos de caldo de cana, hidrolisado hemicelulósico e caldo de cana mais hidrolisado hemicelulósico com as leveduras J10, FT858 e J10 mais FT858. Jaboticabal-SP, 12..... 37

Tabela 2. Resultados médios obtidos para da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para para as Brix e pH, empregando-se mostos de caldo de cana, hidrolisado hemicelulósico e caldo de cana mais hidrolisado hemicelulósico com as leveduras J10, FT858 e J10 mais FT858. Jaboticabal-SP, 2012..... 48

Tabela 3**.** Resultados médios obtidos para da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para as análises de Acidez e Glicerol, empregando-se mostos de caldo de cana, hidrolisado hemicelulósico e caldo de cana mais hidrolisado hemicelulósico com as leveduras J10, FT858 e J10 mais FT858..... 51

Tabela 4**.** Resultados médios obtidos para da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para as análises de as Ácido acético, Xilitol e Etanol no vinho, empregando-se mostos de caldo de cana, hidrolisado hemicelulósico e caldo de cana mais hidrolisado hemicelulósico com as leveduras J10, FT858 e J10 mais FT858. Jaboticabal-SP, 2012..... 52

PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MOSTO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PONTA E PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO - A utilização de diferentes biomassas vegetais como fonte de energia renovável deve contribuir para a redução do uso de combustíveis fósseis, minimizando impactos negativos ao meio ambiente. Como resultado direto da colheita mecanizada da cana, tem-se o aumento de ponteiros e palha nos canaviais, insumo de grande potencial energético que podem ser utilizados para a produção do etanol de segunda geração, aumentando a produção anual de etanol sem acréscimos em áreas de plantio. A hidrólise deste material, torna disponível os açúcares constituintes das frações celulósicas e hemicelulósicas e deve passar por um processo de destoxificação para redução do teor de inibidores provenientes da etapa de hidrólise. Neste estudo objetivou-se avaliar o mosto de hidrolisado hemicelulósico de folhas e ponteiros de cana, em comparação com mosto de caldo de cana, fermentado por leveduras que desdobram hexoses e pentoses para produção de etanol de segunda geração. Os mostos foram compostos por caldo de cana, hidrolisado hemicelulósico de folhas e pontas de cana e pela mistura destes dois mostos (50%). O processo fermentativo foi realizado em escala laboratorial empregando-se as estirpes J10 e FT858 de leveduras e a mistura destas (50%). Foram feitas análises de viabilidade celular e índice de brotamentos e avaliadas as concentrações dos açúcares e produção de etanol. A viabilidade celular, viabilidade de brotos e o brotamento sempre foram maiores em mosto de caldo de cana. Os valores mais elevados entre as leveduras foram obtidos pela linhagem J10. O processo de destoxificação utilizado promoveu uma remoção parcial de ácidos e composto fenólicos. A utilização de coculturas de microrganismos foi mais eficiente na produção de etanol em relação as culturas individuais. O hridrolisado hemicelulósico apresentou baixa eficiência na produção de etanol.

Palavras chave: Fermentação etanólica, biomassa vegetal, xilose.

ETHANOL PRODUCTION FROM HEMICELLULOSIC HYDROLYZATE MUST TIP AND STRAW OF SUGARCANE

ABSTRACT – The use of different plant biomass as a renewable energy source should contribute to reducing the use of fossil fuels, minimizing negative impacts to the environment. As a direct result of mechanical harvesting of sugarcane has increased pointers and straw in the cane fields, input of large energy potential that can be used for the production of second generation ethanol, increasing the annual production of ethanol without increases in areas planting. Hydrolysis of this material makes available the sugars constituting the cellulose and hemicellulose fractions and must undergo a detoxification process for reducing the content of inhibitors from the hydrolysis step. This study aimed to evaluate the wort hemicellulosic hydrolyzate pointers leaves and cane, compared with mash of sugar cane juice, fermented by yeasts that unfold hexoses and pentoses for production of second generation ethanol. The musts were composed of sugarcane juice, hemicellulosic hydrolyzate leaves and cane tips and the mixture of these two musts (50%). The fermentation was performed in laboratory scale employing strains J10 and FT858 yeast and mixing these (50%). Analyzes were performed for cell viability and budding index and evaluated the concentrations of sugars and ethanol production. Cell viability, feasibility and budding shoots were always higher in mash of sugar cane juice. The highest values were obtained between the yeast strain J10. The detoxification process used promoted partial removal of acids and phenolic compounds. The use of cocultures of microorganisms was more efficient in producing ethanol in relation to individual cultures. The hemicellulosic hridrolisado showed low efficiency in ethanol production.

Keywords: Ethanol fermentation, plant biomass, xylose.

1. INTRODUÇÃO

A produção de biocombustíveis é importante para redução da poluição causada pela queima de combustíveis fósseis. Neste sentido o consumo de combustíveis que apresentem menor prejuízo ao ecossistema é fundamental.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo o estado de São Paulo responsável por 61% da produção brasileira. A produção nacional de cana-de-açúcar na safra 2012/2013 foi de 595,13 milhões de toneladas, superando em 6,2% a safra anterior, destinando-se 300,75 milhões toneladas para a produção de etanol (CONAB, 2013).

O etanol é o biocombustível que mais se destaca entre as fontes de energia utilizadas atualmente. Em sua produção, durante a produção da biomassa no campo, as emissões de gases de efeito estufa no ambiente são compensadas através da absorção do CO_2 atmosférico.

Até recentemente o sistema de colheita preconizava o emprego do fogo para despalha da cana-de-açúcar nos canaviais. Este sistema está sendo gradativamente substituído pela colheita que tem se mostrado muito eficiente, embora ainda deve ser aperfeiçoado.

Um dos grandes problemas causados pela colheita mecanizada é o acréscimo de impurezas vegetais na matéria-prima que chega na indústria. O sistema de desponte e despalha dos colmos realizado pelas máquinas, em alguns casos ineficiente, causa aumento do teor de fibra, dificulta o processo de extração do caldo e aumenta a quantidade de bagaço. O aumento da quantidade de folhas no processo pode também influenciar no teor de fenol que prejudica o processo fermentativo.

O bagaço seco e a palha que atualmente são usados na geração de energia, correspondem a dois terços da área plantada, ou seja, apenas um terço da biomassa contida na planta é aproveitado para a produção de etanol ou açúcar. Para cada tonelada de cana, obtém-se aproximadamente 140 kg de bagaço seco, composto por 43% de celulose, 25% de hemicelulose e 23% de lignina, segundo RODRIGUES (2007).

O bagaço, assim como os resíduo da colheita mecanizada, podem ser utilizados para a produção do etanol de segunda geração, o que aumentaria a produção anual de etanol, sem acréscimos das áreas de plantio. Com hidrólise deste material, disponibiliza-se os açúcares constituintes das frações celulósicas e hemicelulósicas.

Após a obtenção do hidrolisado, este deve ser adequado ao micro-organismo fermentados, através da destoxificação da fração hidrolisada para redução do teor de inibidores provenientes da etapa de hidrólise. A utilização de hidrolisados hemicelulósicos no processo fermentativo requer a disponibilidade de microrganismos fermentadores de pentoses, em particular a xilose.

Neste contexto objetivou-se avaliar o mosto de hidrolisado hemicelulósico de folhas e ponteiros de cana em comparação com mosto de caldo de cana, fermentado por leveduras que desdobram hexoses e pentoses (J10, FT858 e J10 + FT858) para produção de etanol de segunda geração. Avaliou-se também a microbiota fermentadora e eficiência do processo fermentativo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biocombustíveis e o futuro

A população mundial ultrapassa 7 bilhões de habitantes. Para que haja água, alimentos e energia, acessível para todos, faz-se necessário o avanço biotecnológico em muitos segmentos, a fim que se produza em grande quantidade, boa qualidade e de forma sustentável.

Fatos históricos como a Revolução Industrial implicaram em mudanças significativas dos meios de produção, que antes era manufaturados, e passou a depender de outras fontes de energia. Neste sentido, o surgimento da indústria, o advento da agricultura, transporte e as alterações no padrão de consumo, implicaram em diversas consequências, especialmente para o meio ambiente (SILVA NETTO; LEAL, 2012).

Atualmente busca-se cada vez mais fontes de energia alternativas, que sejam de origem renovável, com menores impactos ao meio ambiente e para sociedade. Dentre as vantagens que se relaciona para os biocombustíveis, destaca-se a produção da matéria-prima que pode ser adequada de acordo com oferta/procura, possibilitando a competitividade na cadeia produtiva em relação aos derivados do petróleo. (SILVA NETTO; LEAL, 2012).

De acordo com a ANP (Agência Nacional do Petróleo), os Biocombustíveis são definidos como: "Derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de energia" (ANP, 2012). No Brasil, dentre os biocombustíveis líquidos, destacam-se o etanol e o biodiesel, que apresentam, 18% dos combustíveis consumidos no país, percentagem significativa e em expansão.

O bioetanol é um composto orgânico oxigenado, produzido por fermentação, através da conversão dos açúcares contidos no caldo de cana por ação das leveduras liberando gás carbônico e energia.

O incentivo á produção e comercialização de etanol teve início a partir da década de 70, com o surgimento do Programa Brasileiro do Álcool (Proálcool),

criado com a estratégia de minimizar o consumo de combustíveis fósseis em virtude dos sucessivos aumentos nos preços do petróleo (ANP, 2012).

De acordo com a União da Indústria de cana-de-açúcar (UNICA), a fabricação de motores desenvolvidos especialmente para funcionar com etanol hidratado teve um grande crescimento a partir do surgimento do Proálcool sendo que, na década de 80, os carros a etanol representavam 84,4% da produção das montadoras instaladas no país. Entretanto, a queda nos preços do petróleo, no fim dos anos 80, fez declinar significamente a produção de etanol e, no fim da década de 90, somente 1% da frota veicular comercializada apresentava motores apropriados para o uso do etanol (ANP, 2012; UNICA, 2008).

A partir de 2003, com o lançamento dos veículos bicombustíveis, que podem ser abastecidos com álcool e gasolina e/ou suas misturas, a produção de etanol voltou a crescer. Em 2009 foram produzidos 26,1 milhões de metros cúbicos de etanol, valor 1,8 vezes maior que a produção no ano de 2003, o que evidencia a expansão e consolidação do setor sucroenergético (ANP, 2012).

A produção de etanol em 2012 foi de cerca de 23,49 bilhões de litros, 3,21% maior que a produção da safra anterior (CONAB, 2013). De acordo com dados da Federação Nacional da Distribuição de Veículos Automotores (FENABRAVE), os emplacamentos de automóveis, comerciais leves, caminhões e ônibus em 2013 foram 16,11% superior ao registrado em janeiro do ano anterior (FENABRAVE, 2013).

A produção tende à crescer a medida em que os países aderem normas e protocolos a fim de diminuir a emissão de gases de efeito estufa. O setor produtivo deverá experimentar grande evolução mediante o desenvolvimento de tecnologias, especialmente para o melhor uso da biomassa residual da cana, que corresponde a mais ou menos dois terços de sua biomassa total (SILVA NETTO; LEAL, 2012).

2.2. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.)* é uma poácea, semi-perene, suscetível às mudanças climáticas anuais. É cultivada no Brasil desde século XVI, de grande importância econômica, destacando-se na produção açúcar, etanol, cachaça e energia (UDOP, 2012).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, principal matéria-prima para a indústria sucroenergética.

O bagaço que sobra após a extração do caldo, do qual são produzidos o açúcar e o etanol, seu aproveitamento industrial é vasto sendo que já no início do século passado, começou a ser utilizado como combustível substituto à lenha para a geração de calor e energia para a própria usina e em parte comercializada por concessionárias de energia elétrica (SOUZA; AZEVEDO, 2006).

A área cultivada com cana-de-açúcar colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2012/13 foi estimada em 8.520,5 mil hectares. O estado de São Paulo é o maior produtor com 51,87% e a produtividade média brasileira está estimada em 69.846 kg/ha, 4,2% maior que na safra 2011/12, (CONAB, 2013).

Com a colheita mecanizada sem a queima prévia da cana-de-açúcar, mantém-se sobre a superfície do solo uma quantidade considerável de resíduos vegetais, como palha e ponteiros de cana que variam entre 10 a 30 t ha^{-1} (FARONI *et al.,* 2003).

2.3. Matériais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são compostos basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, além de outros componentes presentes em menores quantidades vêm sendo utilizados especialmente para a cogeração de energia. Têm características químicas semelhantes às da madeira, diferindo percentualmente, dependendo das característica genéticas e ambiente de desenvolvimento (FENGEL; WEGENER, 1989).

A celulose $(C_6H_{10}O_5)n$ é um polímero de cadeia longa composto de um só monômero (glicose), classificado como polissacarídeo ou carboidrato. É um dos principais constituintes das paredes celulares das plantas, em combinação com a lignina, com hemicelulose e pectina, não sendo digerível pelo homem, constituindo uma fibra dietética. Alguns animais, particularmente os ruminantes, podem digerir celulose com a ajuda de microrganismos simbióticos (NISHIYAMA, *et al.,* 2002).

A hemicelulose faz parte da composição da parede celular da células vegetais na proporção de até 30%. Quando sofrem hidrólise ácida pode ser decomposta em

diferentes unidades de açúcares, tais como xilose e arabinose (pentoses), glicose, manose e galactose (hexoses), além de ácido urônico e furfural (PATURAU, 1989).

A lignina é um polímero complexo que contém muitas cadeias de monômeros quimicamente distintos que tem função de rigidez na parede celular dos vegetais. É a segunda macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos, representando 20 a 30% da massa total. A molécula de lignina é estável, insolúvel em solventes orgânicos e inorgânicos, conferindo elevada resistência aos tecidos lignificados quanto ao ataque de microrganismos (FENGEL; WEGENER, 1989).

Os resíduos lignocelulósicos são constituídos por substâncias químicas, denominadas compostos fenólicos, que variam em quantidades de acordo com a espécie de ordem de 5 a 20% (FENGEL; WEGENER, 1989). A presença desses compostos pode levar a uma inibição do processo fermentativo, uma vez que esses podem ser tóxicos às leveduras.

2.3.1.Palha de cana-de-açúcar

Representada basicamente por folhas secas, a palha é considerada um resíduo da colheita de cana-de-açúcar. Com o fim da queima prévia do canavial e o advento da mecanização, este resíduo tem sido utilizado atualmente como importante agente sua principal função na reestruturação do solo no canavial.

A palha é a utilizada na lavoura, atuando como cobertura e proteção de solo, representando um terço da energia primária da cana (CGEE, 2009). Difere do bagaço quanto ao menor conteúdo de lignina, maior teor de cinzas e baixa umidade (TEODORO *et al.,* 2011, SANTOS *et. al.,* 2012)

Não obstante segundo BRAUNBECK e MAGALHÃES, “na colheita mecânica, sem queima prévia, existe um compromisso antagônico, complexo, entre a operação de limpeza e as perdas de colheita. Canas colhidas com teor de impurezas vegetais inferior a 6 % frequentemente provocam perdas próximas de 10%. Parte dessas perdas originam-se no corte de base e alimentação da colhedora. Com o auxílio mecânico as folhas são retiradas dos colmos inteiros que resultam em colmos limpos e folhas, que têm propriedades aerodinâmicas muito diferentes facilitando sua separação. Esta acontece espontaneamente durante o processo de lançamento dos

colmos, na saída do despalhador, já que a pouca massa das folhas não permite acumular energia cinética suficiente para acompanhar os colmos na trajetória até a carreta de descarga vertical" (BRAUNBECK; MAGALHÃES, 2002).

2.3.2. Ponteiros de cana-de-açúcar

"Durante o processo de colheita da cana-de-açúcar existe a necessidade de retirar ponteiros visando aumentar e eficiência industrial de extração de açúcar e reduzir o custo de transporte da matéria-prima. Os dispositivos utilizados nas colhedoras para conduzir o extremo superior dos colmos até o mecanismo cortador não tem desempenho eficiente, principalmente nos canaviais de 18 meses onde a incidência de colmos deitados é maior. No caso do auxílio mecânico os ponteiros são cortados pelos operadores que apontam individualmente cada colmo a um disco que corta e recebe o ponteiro para efetuar seu enfardamento junto com as folhas" (BRAUNBECK; MAGALHÃES, 2002).

Os ponteiros, assim como as folhas dos colmos da cana-de-açúcar, contém grande quantidade de compostos fenólicos que quando adicionados ao processo podem interferir negativamente no processo produtivo do açúcar e do etanol. No entanto, este material tem grande potencial para a produção de etanol de segunda geração, através de hidrolise, tornando-se acessível os açúcares constituintes em suas frações celulósicas e hemicelulósicas.

2.4. Obtenção de açúcares a partir da hidrólise ácida de resíduos lignocelulósicos

A obtenção de açúcares a partir de materiais celulósicos pode ocorrer através dos processos químicos (ozônio, ácido diluído ou concentrado e alcalino), físicos (picadores e moagem) e biológicos (utilização de fungos) (SANTOS, 2010).

A hidrólise ácida é eficiente, possibilitando até 90% de recuperação dos açúcares fermentescíveis, de acordo com RODRIGUES, (2007). Entretanto, parte dos açúcares podem ser degradados devido ao tempo de hidrólise, gerarando alguns produtos inibidores da fermentação, tais como compostos fenólicos, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, dentre outros.

A hidrólise ácida é realizada com a adição de ácido sulfúrico sob ação de diferentes temperaturas e tempo de tratamento. Ao final da reação tem-se um resíduo sólido composto pela fração celulósica e lignina (POURQUIE; VANDECASTEELE, 1985) e o líquido resultante da hidrólise da fração hemicelulose, composto por açúcares.

Durante a hidrólise são gerados dois tipos de açúcares: as pentoses e as hexoses. As pentoses são provenientes da hidrólise da fração hemicelulose, e as hexoses são geradas pela degradação de parte das hemiceluloses e celulose. A fração líquida obtida após a hidrólise da celulose pode ser usada para a fermentação etanólica (RABELO, 2007).

Os micro-organismos mais promissores capazes de fermentar não só as hexoses (açúcares compostos por 6 carbonos) como também as pentoses (açúcares compostos por 5 carbonos) são: *Pichia stipitis, Candida shehatae e Pachysolan tannophilus* (CHANDEL *et al.,* 2007); *Candida guilliermondii* e *Rhodotorula glutinis* (FUGITA, 2010).

2.5.Metabolismo de glicose, xilose e arabinose para produção de etanol

A utilização de xilose por leveduras é possível graças à capacidade que alguns destes microrganismos apresentam de metabolizar a xilose (Figura 1).

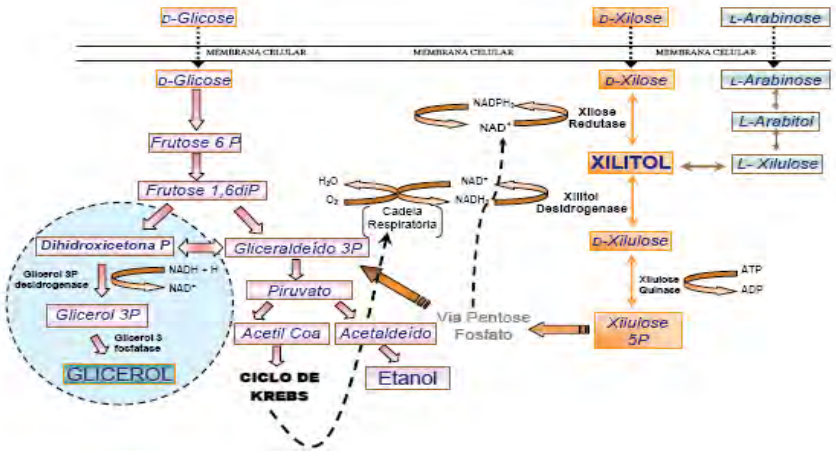


Figura 1. Fluxograma da via de obtenção de xilitol e etanol a partir dos açúcares glicose, xilose e arabinose (ARRUDA, 2007).

Na fermentação, os microrganismos produzem duas moléculas de ATP, e no processo de respiração tem-se 38 ATPs, em que ocorre a formação da biomassa

celular (LEHNINGER *et al.,* 2000). A levedura sendo um microrganismo facultativo realiza estas duas vias metabólicas de acordo com as concentrações de açúcares no meio fermentativo que influenciam o processo (FUGITA, 2010).

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

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

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

2.6.Leveduras metabolizadoras de xilose.

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

No setor sucroenergético as o micro-organismo utilizado corresponde à *S. Cerevisiae,* que apresenta habimidade para degradar hexoses em etanol (RABELO, 2007). Segundo TOIVOLA, estas são incapazes de fermentar pentoses provenientes da hidrólise da biomassa vegetal, como o bagaço de cana-de-açúcar. (TOIVOLA *et al.,* 1984).

Neste sentido o conhecimento de micro-organismos que fermentam pentoses ainda é limitado (HAHN-HARGERDAL *et al.,* 1994). Dentre as principais espécies

que apresentam habilidade de fermentar xilose, pode-se citar: *Pachysolen tannophilus* (CHENG *et al.,* 2008); *Kluyveromyces marxianus* (MARGARITIS; BAJPAI, 1982); (CANILHA *et al.*, 2010), *Candida guilliermondii* (FELIPE *et al.,* (1995); (ALVES *et al.*, 1998); (ARRUDA; FELIPE, 2009), *Candida shehatae* (CHANDEL *et al.,* 2007), *Spathaspora arborariae, Candida shehatae* e *Pichia stipitis* (PEREIRA, 2010). Leveduras do gênero *Rhodotorula* são relatadas como metabolizadoras de xilose, mas não produtoras de etanol GONG *et al*., (1981); (McMILAN, 1993).

As linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas pelo setor sucroenergético apresentam alta produção de etanol, tolerância a compostos inibitórios, tais como, ácidos acéticos, fenóis, furfural, 5-hidroximetilfurfural, principais compostos inibitórios do caldo hidrolisado hemicelulósico (HAHN-HAGERDAL *et al*., 2007). Fermentam em baixo pH e em temperaturas brandas, têm alta viabilidade celular, entretanto estas são incapazes de metabolizar as pentoses, exceto aquelas que estão sendo pesquisadas e modificadas geneticamente (SALLES, 2010).

Dessa forma, estudos com hidrolisado hemicelulósico vem sendo conduzidos por vários autores (MOUTTA, 2009; ARRUDA, 2011); para que a produção de etanol por materiais lignocelulósico seja eficaz, estudos com isolamento e melhoramento genético vem sendo realizado (LYND, 2005).

Segundo WALKER (1998), existe alguns contrastes na fermentação industrial de pentoses a etanol, tais como a baixa tolerância ao etanol por leveduras fermentadoras de pentose. Também, a presença de glicose nos hidrolisados hemicelulósicos pode atuar como repressora dos genes responsáveis pela utilização da xilose.

2.7.Cocultura de leveduras

A fim de melhorar a competitividade de custos da produção de bioetanol e aumentar a rentabilidade de um processo industrial, se faz necessária a conversão eficiente dos monossacarídeos presentes nos hidrolisados (GUPTA *et al.,* 2009; FU *et al.,* 2009). Segundo FROMANGER *et al.,* (2010), a conversão de pentoses, que representam cerca de 24-40% de açúcares é um dos principais desafios a ser superado para tornar a tecnologia do etanol de segunda geração viável.

Como as pentoses não podem ser fermentadas por linhagens de *S. cerevisiae*, e cepas recombinantes desta espécie ainda não se mostraram eficientes em escala industrial (HAHN-HAGERDAL *et al.,* 2007), uma solução para conversão de xilose em etanol é a utilização de cocultura de cepas eficientes em fermentação de xilose concomitantemente a *S. cerevisiae*. De acordo com BADER *et al*., (2009), o uso de coculturas pode ser vantajoso em relação á fermentação individual por causa do potencial para a utilização sinérgica das vias metabólicas de todas as cepas envolvidas.

A maioria dos trabalhos realizados neste campo utilizaram duas leveduras: *S. cerevisiae e P. stipitis* (ROSSELL, 2007).

As dificuldades encontradas pelo autor foram:

- ✓ O metabolismo da xilose procede mais lentamente que o da glicose, provocando a inibição alcoólica sobre o micro-organismo que metaboliza as pentoses;
- ✓ Repressão catabólica da glicose sobre a utilização da xilose;
- ✓ Competição entre a *S. cerevisiae* e a levedura responsável pela fermentação da xilose, pelo oxigênio presente no meio;
- ✓ Possível incompatibilidade entre as duas cepas.

Assim estudos com estirpes com habilidades de desdobrar diferentes açúcares são importantes para que a produção de etanol de segunda geração seja viabilizada.

2.8. Conversão de biomassa a etanol

O Brasil é um país que integra totalmente a produção de açúcar e de etanol na mesma planta, reduzindo os custos de ambos os processos. Sendo assim, integrar o processo de hidrólise nas usinas seria um passo fácil e muito importante CAMARGO (2007).

Com o uso de materiais lignicelulósicos e tecnologias novas de conversão, a produção de etanol poderá aumentar entre 50 e 100% por hectare. Assim, pode-se pensar no Brasil produzindo 200 a 300 bilhões de litros de etanol por ano, de forma

sustentável e mais barato do que qualquer outra fonte energética (CAMARGO, 2005).

As biomassas requerem processamento extensivo para a transformação em açúcares fermentescíveis e posteriormente uma conversão biológica para produção de combustíveis e outros produtos químicos. A disponibilidade da biomassa, sua posição e transporte ao local do tratamento, as estratégias de pré-tratamento, os agentes hidrolíticos eficientes e a disponibilidade de micro-organismos fermentativos, todos impactam nos custos para a fabricação do etanol (KNAUF; MONIRUZZAMAN, 2004).

O rendimento da fermentação depende de vários fatores como a composição e condição do meio em que está inserida, quantidade de nutrientes no caldo e a atuação das leveduras, estes são essenciais para os processos metabólicos, pois, qualquer contaminante que compete pelos nutrientes, interfere de maneira negativa, ocasionando menor eficiência e menor rendimento alcoólico.

Os benefícios da tecnologia de transformação da biomassa em etanol têm sido previamente indicados graças à: segurança de energia aumentada, redução em emissões de gás que causam o efeito estufa, uso de recursos renováveis, fundação de indústrias de processos químicos, benefícios macroeconômicos para comunidades rurais e a sociedade. Apesar de todas essas vantagens, a comercialização e a aplicação difundida da utilização da biomassa lignocelulósica ainda é lenta e pouco expressiva (FUGITA, 2010). Por este motivo novas pesquisas precisam ser realizadas, a fim de que se viabilize seu processo produtivo.

2.9. Compostos inibidores.

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

De acordo com MARTIN; JONSSON, (2003), a maioria das leveduras, inclusive as estirpes industriais, são suscetíveis a vários compostos inibidores derivados da hidrólise ácida e especialmente suscetíveis à presença de múltiplos inibidores.

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

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

Os furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) são compostos que afetam os micro-organismos, pois reduzem suas atividades enzimáticas e biológicas, quebram o DNA e inibem a síntese de RNA e proteínas (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988); (MODING *et al.,* 2002).

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

Alterações de pH do hidrolisado hemicelulósico no processo de destoxificação modificam as concentrações de açúcares, nutrientes e dos compostos tóxicos. A adsorção do carvão ativo após o ajuste de pH, tem a função de clarear ou filtrar, para que esta reação ocorra deve se ter a carbonização e a ativação. Com a utilização dos mesmos deve-se levar em conta o tamanho dos poros desta molécula, uma vez que esta está ligada à adsorção, pois quanto maior o poro, maior a capacidade de adsorver moléculas grandes (AHMEDNA; MARSHALL; RAO, 2000).

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

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

Micro-organismos fermentadores que metabolizam as pentoses vêm sendo isolados e modificados geneticamente, mas o rendimento em etanol ainda não é suficiente para tornar o processo economicamente atrativo. Diversos produtos de degradação, tais como o ácido fórmico, acético, furfural, hidroximetilfurfural e fenóis, produzidos durante o pré-tratamento e a hidrólise, podem inibir o processo de fermentação e afetar rendimentos do etanol, devendo assim ser removidos ou suavizados (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Segundo CHANDEL *et al.,* (2007), ao analisar os custos do processo de hidrólise, deve ser levado em consideração os compostos que inibem o crescimento dos micro-organismos, formados pela hidrólise do material em questão.

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

3. MATERIAL E MÉTODOS

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

3.1. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o em parcelas sub-subdivididas sendo as parcelas os 3 mostos avaliados (caldo de cana, hidrolisado hemicelulósico de folhas e ponteiros de cana e da mistura destes dois mostos) e as sub parcelas 3 as leveduras (J10, FT858 e a mistura (50%) das duas estirpes), com quatro repetições.

3.2. Matéria-prima

A palha e os ponteiros de cana-de-açúcar da cultivar RB867515 foram colhidos em área de produção no município Jaboticabal/SP, durante a safra 2011/2012.

Após coleta, o material foi mantido em estufa com circulação de ar a 60ºC até atingir massa constante. A umidade contida no material foi determinada por exposição do material à radiação infravermelha, em temperatura de 105°C durante 20 min. (ORION, modelo MB200) (MORAES, 2008).



Figura 2. Amostra de Palha e ponteiros de cana-de-açúcar antes de serem triturados e secos em estufa, Jaboticabal, 2012.

3.3. Hidrólise e concentração do hidrolisado hemicelulósico da palha e ponteiros de cana.

O material, após secagem, foi submetido à hidrólise ácida branda, na qual principal fração removida foi a hemicelulósica, em reator de aço inoxidável com capacidade para 40L. O reator foi carregado com 2kg de palha e ponteiros de cana-de-açúcar, 20L de água e 105mL de ácido sulfúrico (MORAES, 2008). A caracterização e a concentração do caldo hemicelulósico foi feita segundo MORAES (2008).

Foram realizados dois ciclos de hidrólise, sob temperatura constante de 121ºC durante 20 minutos, para se obter 24L de hidrolisado. A fração líquida (hidrolisado hemicelulósico) foi obtida após filtração para separação da fração sólida, denominada celulignina.

Os hidrolisados e o caldo de cana foram misturados e homogeneizados e encaminhados para a quantificação das características químico tecnológicas. Foram quantificados os teores de Monossacarídeos totais e Ácido acético por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC); o Brix foi determinado em refratômetro digital; o pH registrado por leitura direta em medidor digital Digimed (DMPH – 2) com correção de temperatura; Acidez total dos caldos e mostos segundo CTC, (2005) e Compostos fenólicos segundo FOLIN; CIOCALTEAU (1927).

Considerando-se os baixos teores de açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico obtido, realizou-se a concentração do hidrolisado ocorreu em concentrador a vácuo, com capacidade útil de 5L, operando a 70±5ºC, esta era conduzida até que se obtivesse um caldo mais concentrado em açúcares que foi empregado para o preparo do mosto. A seguir todas as análises citadas a cima foram refeitas.

3.4. Determinação da composição da palha e ponteiros de cana-de-açúcar

Foram caracterizadas as principais frações quanto ao teor de celulose, hemicelulose, lignina e energia bruta antes e após a hidrólise da fração hemicelulósica (VAN SOEST; ROBERTSON, 1985).

3.5. Destoxificação do hidrolisado da palha e ponteiros e clarificação do caldo de cana

A destoxificação foi realizada segundo metodologia descrita por (MARTON, 2002). Primeiramente, o pH foi ajustado para 7,0 pela adição de óxido de cálcio (CaO), seguido pela sua redução até pH 4,0 utilizando ácido fosfórico (H_3PO_4). Após esta etapa, o hidrolisado foi submetido ao processo de adsorção empregando-se 1% (m/v) de carvão ativo em incubadora a 50ºC durante 30 min. Ao final de cada etapa de alteração de pH o hidrolisado foi centrifugado, recebendo a adição de carvão, e posteriormente filtrado.



Figura 3. Processo de destoxificação do hidrolisado da fração hemicelulósica do material (etapa 1- Adição de CaO e Centrifugação, 2- Adição de ácido fosfórico e Centrifugação, 3- Adição de carvão ativado e filtração e 4- Hidrolisado destoxificado).

O caldo de cana foi submetido a um processo de clarificação com adição de leite de cal [$Ca(OH)_2$] ($6^oBé$) até o ajuste do pH para 6,0. Logo após e o caldo foi aquecido até 105° e transferido para provetas de 1000mL onde ocorreu a decantação da borra. O sobrenadante, resultado da decantação, foi filtrado para remoção de impurezas presentes no caldo.

As adequações feitas nos caldos seguiram os parâmetros sugeridos para Brix e pH normalmente utilizados em fermentações a partir de caldo de cana. Após o processo de clarificação no caldo de cana e a destoxificação no hidrolisado hemicelulósico estes estavam adequados para serem utilizados no preparo dos mostos.

3.6. Análises tecnológicas

O Brix foi determinado em refratômetro digital. O pH foi quantificado por leitura direta em medidor digital Digimed DMPH – 2, com temperatura corrigida em 25ºC. A acidez total determinada através da titulação do caldo em agitação com NaOH padrão 0,05N (COPERSUCAR, 2001).

3.7. Determinação da concentração de fenóis totais no hidrolisado

A concentração de fenóis totais foi determinada através do método de Folin-Ciocalteau, utilizando-se 0,5mL de caldo hidrolisado concentrado e caldo hidrolisado concentrado destoxificado diluído dez vezes em metanol acidificado (1% HCl), 2,5mL de reativo de Folin-Ciocalteau e 2,0mL de carbonato de sódio 7,5%. A mistura foi incubada a 45ºC por 15 min., e quantificada através da leitura em absorbância em espectrofotômetro a 765nm (FOLIN; CIOCALTEAU, 1927).

3.8. Microrganismos fermentadores

Foram utilizadas as seguintes linhagems de leveduras:

- J10 (*Rhodotorula glutinis)* obtida através de cultura estoque, mantida à 4ºC, proveniente do Banco de Leveduras do Laboratório de Tecnologia do Açúcar e Etanol- Microbiologia das fermentações do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal – SP, que segundo GUIDI (2000) apresenta habilidade em metabolizar xilose;
- FT858 *(Saccharomyces cerevisiae)* selecionada ativa e desidratada, armazenada em embalagem inviolada em ambiente seco, arejado e protegido do sol. Tem como características: elevado rendimento fermentativo, resistente a baixo pH, tolerância a alto teor alcoólico, viabilidade elevada durante reciclos fermentativos, pouca formação de espuma, não é floculante, com boa velocidade de fermentação e baixo açúcar residual no vinho (AMORIM, 2011).

Para reativação das culturas, os inóculos foram transferidos assepticamente para um tubo de ensaio contendo 5mL do meio GYMP, descrito por LODDER (1970), composto por glicose 20 g/L, extrato de malte 1 g/L, extrato de levedura 0,5 g/L, fosfato de sódio monobásico 0,20 g/L e Agar 1,7 g/L; mantidos por 72 h a 30ºC (GUIDI, 2000). Após este período foi realizada reativação fermento com o mesmo meio, durante 24 horas a 30ºC até quantidade em massa suficiente para atingir 10^7 UFC/mL.

3.9.Crescimento de massa celular

A partir de um tubo de ensaio estoque, transferiu-se os dois inóculos selecionados assepticamente, com auxilio de uma alça de platina esterilizada por flambagem, para um erlenmeyer contendo 120mL de meio YM (Yest medium) autoclavado. As culturas permaneceram em agitação a 160 rpm, por 48 h a 30ºC em agitador orbital (GUIDI, 2000).

Em seguida, centrifugou-se o meio de cultura com o inóculo, descartando-se assim a fração líquida e recuperando-se a massa celular através de centrifugação. Submeteu-se as leveduras a adaptação em ambiente com concentração crescentes de glicose, utilizando-se o meio YM com 2%, 4%, 6% e 8% por 72 h em agitador orbital. Através de câmara de Neubauer LEE et al. (1981), determinou-se a viabilidade celular inicial, e durante 72 h recuperou-se a quantidade de massa celular de ambas estirpes suficiente para iniciar a fermentação, ou seja 10^7 UFC/mL.

3.10. Tratamentos

Para instalação dos experimentos utilizou-se os seguintes tratamentos:

1 - Mosto de hidrolisado hemicelulósico + levedura J10;

2 - Mosto de hidrolisado hemicelulósico + levedura FT858;

3 - Mosto de hidrolisado hemicelulósico + levedura J10 + FT858 (50%);

4 - Mosto de caldo de cana + levedura J10;

5 - Mosto de caldo de cana + levedura FT858;

6 - Mosto de caldo de cana + levedura J10 + FT858 (50%);

7 - Mosto de hidrolisado hemicelulósico + Mosto de caldo de cana (50%) + levedura J10;

8 - Mosto de hidrolisado hemicelulósico + Mosto de caldo de cana (50%) + levedura FT858;

9 - Mosto de hidrolisado hemicelulósico + Mosto de caldo de cana (50%) + levedura J10 + FT858 (50%);

3.11. Condução das fermentações

O processo fermentativo foi realizado em escala laboratorial utilizando-se erlenmeyers de 500mL, contendo 180mL de mosto de hidrolisado hemicelulósico, mosto de caldo de cana e mosto de hidrolisado hemicelulósico mais caldo de cana (50%), que foram preparados ajustando-se o Brix para 16 ± 0,3°; pH de 4,5 ± 0,5; temperatura de 30°C; 10^7 UFC/mL das estirpes de leveduras J10, FT858 e a mistura destas na proporção de 50%, com agitação constante em agitador orbital por 72h mantendo-se a temperatura em torno de 30°C, com quatro repetições.

3.12. Microbiologia das fermentações

Foram determinados segundo metodologia proposta por LEE *et al.,* (1981), os parâmetros microbiológicos: viabilidade celular das leveduras, viabilidade de brotos e índice de brotamentos, que foram calculados através das seguintes fórmulas:

Viabilidade Celular % = células vivas x 100/células vivas + células mortas

Viabilidade de Brotos % = brotos vivos x 100/ brotos vivos + células mortos

Índice de Brotamentos % = brotos vivos x 100/ células vivas + células mortas

3.13. Determinação das concentrações de monossacarídeos totais, ácido acético, produção de etanol e xilitol durante a fermentação.

As concentrações dos monossacarídeos totais, ácido acético, etanol e xilitol do caldo hidrolisado concentrado, caldo concentrado destoxificado e vinho dos três mostos em estudo, foram determinadas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters, Milford, MA) operado com coluna Biorad Aminex HPX-87H, empregando-se as seguintes condições: temperatura da coluna de 45ºC, eluente, solução de H_2SO_4 0,005mol/L, fluxo de 0,6mL/min, volume da amostra injetada 20µL. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro Sep Pack C18 (Millipore) e antes do uso, filtrados a vácuo em membrana Hawp 0,45 Millipore e em seguida desgaseificado em banho ultra-som (Microsonic SX-50) por 15 min (MORAES, 2008). As análises foram realizadas no hidrolisado concentrado, hidrolisado concentrado destoxificado e no final da fermentação dos mosto de

hidrolisado hemicelulósico, caldo de cana e hidrolisado hemicelulósico + caldo de cana.

3.14. Determinação de glicerol

O método para análise do teor de glicerol do vinho delevurado foi determinado conforme COPERSUCAR (2001).

3.15. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo Teste F e à comparação entre as médias realizada pelo teste de Tukey. Foi utilizada a análise de regressão polinomial, usando-se o Software AgroEstat (BARBOSA; MALDONADO, 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição do material lignocelulósico

A composição química da biomassa utilizada nesse estudo constituída por ponteiros e palha de cana, está apresentada no quadro 1. Da sua análise verifica-se que os teores de celulose e hemicelulose que podem ser considerados reduzidos quando comparados aos resultados relatados por SANTOS *et al.,* (2012) que observou para palha-de-cana 40-44 (celulose), 30-32 (hemicelulose) e 22-25 (lignina).

Após a operação de hidrólise, os valores obtidos para os teores de celulose e hemicelulose apresentaram-se reduzidos enquanto os teores de lignina e energia bruta aumentaram (quadro 1). Valores obtidos por GOUVEIA, 2009 para bagaço de cana, indicam teores de celulose, hemicelulose e lignina em torno de 48%, 7,8% e 34,5% respectivamente. Estas diferenças podem ser resultante das características da palha e pontas da cana utilizada, que estruturalmente são menos rígidas do que o bagaço que provém dos colmos da cana. Deve-se considerar ainda que os estudos feitos nesta área apresentaram resultados médios de diversas cultivares, enquanto nesta pesquisa utilizou-se a cultivar RB867515.

Quadro 1. Resultados obtidos para Celulose, Hemicelulose, Lignina e Energia Bruta em (%) da ponta e palha de cana-de-açúcar antes e após hidrólise da fração hemicelulósica, Jaboticabal-SP, 2012.

	Celulose (%)	**Hemicelulose (%)**	**Lignina (%)**	**Energia Bruta (%)**
Material antes da Hidrólise	37,32	35,98	5,52	3981,39
Material depois da Hidrólise	22,44	28,71	11,80	4020,25

Analisando-se a energia bruta após a hidrolise da fração hemicelulósica da matéria-prima (quadro 1), verifica-se ainda o grande potencial para a produção de energia elétrica que pode ser obtido a partir do resíduo da hidrólise posteriormente a remoção dos açúcares para o processo fermentativo. Verifica-se um aumento da energia bruta após o processo de hidrólise o que sustenta a produção de energia mesmo com a produção de etanol de segunda geração.

4.2. Avaliação tecnológica dos caldos e mostos

Os resultados médios obtidos para os teores de monossacarídeos totais, ácido acético, pH, acidez total, Brix e compostos fenólicos do caldo de cana extraído, hidrolisado hemicelulósico e hidrolisado hemicelulósico concentrado estão apresentados no quadro 2.

Quadro 2. Resultados médios obtidos para as análises tecnológicas do caldo de cana, hidrolisado hemicelulósico de ponta e palha de cana-de-açúcar e hidrolisado hemicelulósico concentrado, Jaboticabal-SP, 2012.

	Caldo de cana	Hidrolisado Hemicelulósico	Hidrolisado concentrado
Monossacarídeos totais	119,7 g/L	37,33 g/L	91,7 g/L
Àcido Acético	0 g/L	2,06 g/L	0,964 g/L
pH	5,07	1,30	0,85
Acidez total	0,56 (gH_2SO_4/L)	11,58 (gH_2SO_4/L)	35,03 (gH_2SO_4/L)
Brix	19,3	7,1	19,1
Compostos fenólicos	3,16 g/L	20,02 g/L	57,76 g/L

Com os resultados obtidos pode-se afirmar que a cana se encontrava em seu período útil de colheita (PUI), se levarmos em consideração os parâmetro pH e Brix. Entretanto considerando-se a quantidade de monossacarídeos totais sugeridos por AMORIM, (2005), verifica-se que deveria ser maior que 14% e os valores obtidos foram menores. Os teores de compostos fenólicos pode ser considerada alta já no caldo de cana.

Para os hidrolisados observa-se um baixo teor de açúcares, altos teores de ácido acético, baixo pH, acidez total e composto fenólicos muito elevados. sendo

Após a concentração observou-se incremento dos teores de monossacarídeos totais, Brix e compostos fenólicos, com redução de pH e ácido acético.

Este comportamento é resultante de reações que ocorrem no processo de hidrólise, catalisadas por ácidos, que se originam uma série de compostos derivados do furano (furfural e hidroximetilfurfural), que podem ser degradados em ácidos alifáticos (fórmico e levulínico), originando o ácido acético, procedente da hidroxila dos radicais acetila da hemicelulose (ROSSELL, 2006).

Cabe ressaltar ainda, que o processo de concentração promove a concentração do teor de sólidos solúveis, que para os açúcares podem representar um aumento de 59,3%. Para os compostos fenólicos, este aumento pode ser de até de 65,34%. Estes quando comparados aos valores relatados na literatura, apresentam-se muito elevados (MARTIN *et al.,* 2007). Os fenóis podem inibir a fermentação (POLAKOVIC *et al.,* 1992), afetando diretamente a viabilidade celular e a produção de etanol (RAVANELI *et al.,* 2006; GARCIA *et al.,* 2010).

O quadro 3 apresenta os resultados médios obtidos para as análises químico tecnológicas avaliadas. Da sua análise verifica-se comportamento semelhante nos três mostos para o pH e Brix (quadro 3), enquanto a acidez foi maior para o mosto de hidrolisado hemicelulósico, bem como os valores obtidos para compostos fenólicos.

A quantidade de açúcares obtidos a partir de ponteiros e palha de cana foi 37,21% maior do que a observada por FUGITA, (2010) trabalhando com bagaço de cana.

Houve perda de açúcares (6,69%) no preparo do mosto a partir de caldo de cana e quando se utilizou o hidrolisado hemicelulósico (11,67%). Deve-se destacar que após o processo de destoxificação houve diminuição na faixa de 51,18% no teor de compostos fenólicos, entretanto este tratamento foi suficiente para que possibilitar a remoção maior destes compostos valor se enquadrasse para uma fermentação. SILVA (2006) observou uma remoção de 62,55% no teor de fenóis em seu estudo e destacou que ainda pode ser considerado prejudicial para o processo fermentativo.

Quadro 3. Resultados médios obtidos para as análises tecnológicas dos mostos a partir de caldo de cana, hidrolisado hemicelulósico de ponta e palha de cana-de-açúcar e a mistura de ambos, Jaboticabal-SP, 2012.

	Mosto de caldo de cana	Mosto de hidrolisado hemicelulósico	Mosto de caldo de cana + hidrolisado hemicelulósico
Monossacarídeos totais	111,7 g/L	81 g/L	97,5 g/L
Àcido Acético	0 g/L	3,1 g/L	1,7 g/L
pH	4,51	4,24	4,31
Acidez Sulfúrica	0,73 (gH_2SO_4/L)	5,72 (gH_2SO_4/L)	2,69 (gH_2SO_4/L)
Brix	16,1	16	16,3
Fenol	1,74 g/L	28,20 g/L	18,02 g/L

4.3. Viabilidade Celular

Os resultados médios obtidos para viabilidade celular de leveduras estão apresentados na tabela 1. Quando se comparou os três mostos verifica-se que o melhor resultado foi observado para o mosto preparado a partir do caldo de cana, sendo sua viabilidade 22,33% superior à encontrada para o mosto de hidrolisado hemicelulósico. Quando se compara as estirpes de leveduras, observa-se que a J10 apresentou maior viabilidade, seguida pelo mix (J10 + FT858) e FT858 que apresentaram os melhores valores médios.

Relatos de FUGITA (2010) asseguram que as leveduras apresentaram um desempenho inferior quando o mosto foi preparado a partir de hidrolisado hemicelulósico, chegando a viabilidade celular a 5,4%, o brotamento 21,5%, e a viabilidade de brotos 4,4% menores. Estes valores médios indicam que os compostos contidos no hidrolisado prejudicaram a viabilidade celular durante a fermentação.

Os resultados obtidos neste estudo indicam reduções significativas para as análises microbiológicas. Este fato pode estar relacionado às diferenças tanto entre as matérias-primas utilizadas e às características tecnológicas de seus mostos. Neste sentido pode-se constatar que os compostos fenólicos, que são inibidores do

metabolismo das leveduras apresentaram teores de 91,5% maiores, quando considerou-se o mosto produzido a partir de hidrolisado hemicelulósico. Este pode estar relacionado com a queda da viabilidade observada para as células de leveduras durante o processo fermentativo (tabela 1 e figura 4 e 5).

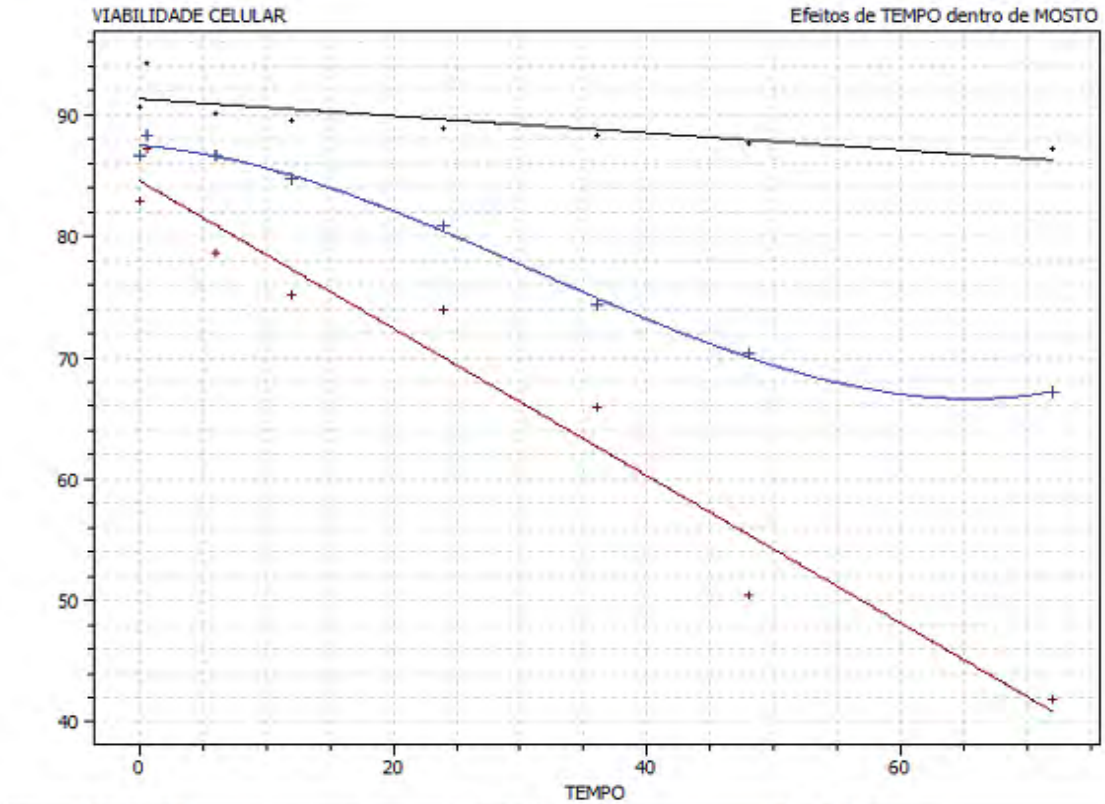
Tabela 1. Resultados médios obtidos para da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para as análises microbiológicas, empregando-se mostos de caldo de cana, hidrolisado hemicelulósico e caldo de cana mais hidrolisado hemicelulósico com as leveduras J10, FT858 e J10 mais FT858. Jaboticabal-SP, 2012.

Causas de variação	Viabilidade Celular (%)	Brotamentos (%)	Viabilidade dos Brotos (%)
Mosto			
Caldo de cana	89,58A	7,23A	89,31A
Hidrolisado hemicelulósico	69,50C	3,13C	62,07C
Caldo de cana + Hidrolisado hemicelulósico	79,89B	5,84B	75,91B
TF	347,73**	55,57**	106,07**
dms (5%)	2,1263	1,1022	5,2221
C.V.	6,6233	50,6115	17,1029
Leveduras			
J10	84,56A	6,01A	80,02A
FT858	75,30 C	4,90B	69,86B
J10 + TF858	79,12B	5,29B	77,40AB
TF	72,86**	11,06**	5,43*
dms (5%)	1,9678	0,6104	8,1683
C.V.	6,7056	30,6603	29,2663
Período de incubação (horas)			
Pé-de-cuba	89,90 A	2,86 B	76,89 AB
0	86,78 AB	3,11 B	81,85 A
6	85,10 B	6,21 A	78,83 AB
12	83,17 BC	5,97 A	83,25 A
24	81,24 C	5,64 A	80,25 AB
36	76,19 D	5,70 A	68,55 BC
48	69,45 E	6,75 A	74,14 ABC
72	65,41 F	6,97 A	62,33 C
TF	98,59**	23,34**	6,22**
dms (%)	3,7613	1,4014	12,4412
C.V.	6,5353	35,8926	22,728
D- Interação			
A x B x C	2,20**	2,13**	2,17**

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, ** = significativo 1% de probabilidade, dms = diferença mínima significativa, C.V. = coeficiente de variação.

A queda na viabilidade ao longo dos ciclos fermentados (figura 4) pode ter ocorrido em função do estresse acumulado pela levedura, provocado pela presença das biomoléculas inibidoras do processo fermentativo, tais como compostos fenólicos e ácidos, além da presença de contaminantes (RAVANELI, 2010)

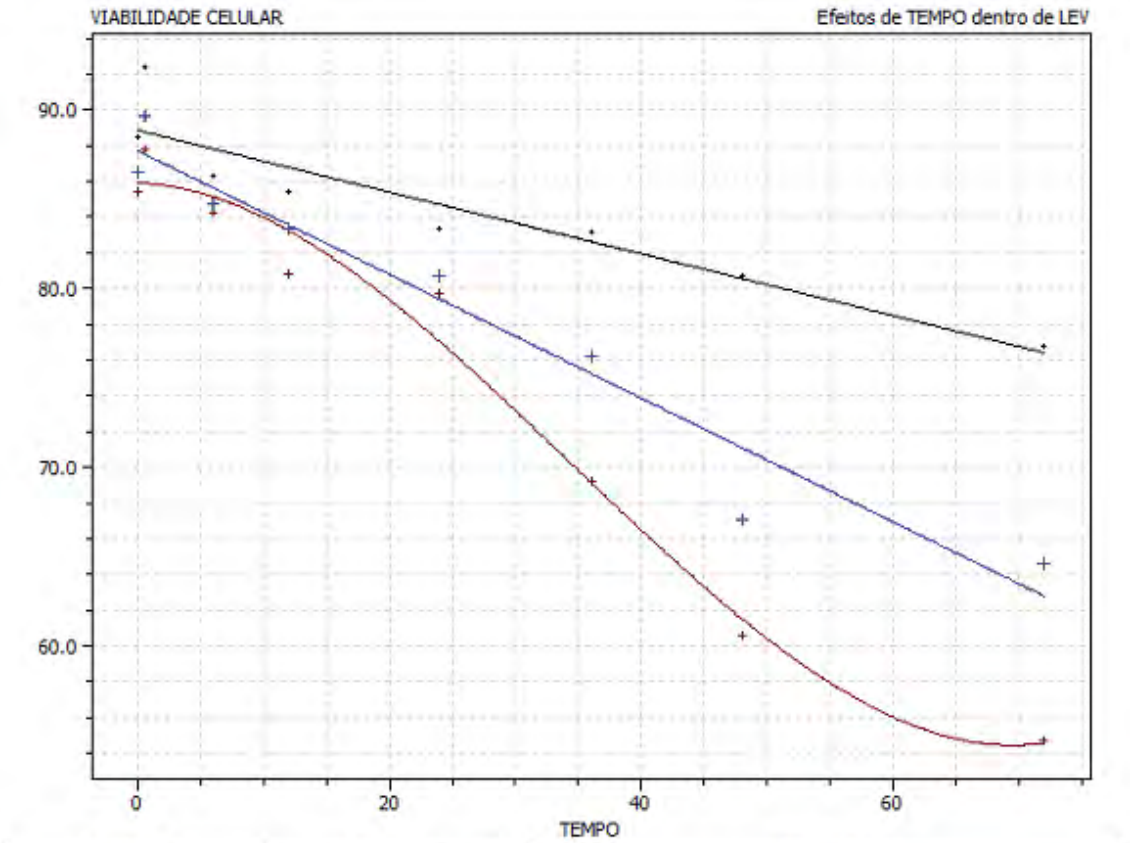
Observa-se neste caso que a maior viabilidade ao longo do tempo foi mantida para o mosto preparado a partir de caldo de cana, sendo que a menor viabilidade ocorreu no mosto preparado a partir de hidrolisado hemicelulósico cujos valores decresceram até o final do período. Quando o mosto era constituído pela mistura de de caldo de cana + mosto de hidrolisado, observou-se resultado positivo no sentido de favorecer a maior manutenção da viabilidade de celular ao longo do período estudado. Verifica-se que a redução dos valores menos acentuada, sendo que ao final das 72 horas superior a 66%.



LEGENDA	F	R²	EQUAÇÕES
TEMPO d. MOS Caldo de C	10,03**	0,6512	y = 91,3236567 - 0,07007559x
TEMPO d. MOS Hidrolizad	751,97**	0,9589	y = 84,5579592 - 0,60665159x
TEMPO d. MOS Mix	4,22*	0,9954	y = 87,4762069 - 0,07696787x - 0,01221818x² + 0,00013031x³

Figura 4. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para viabilidade celular (%) do mosto de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2012.

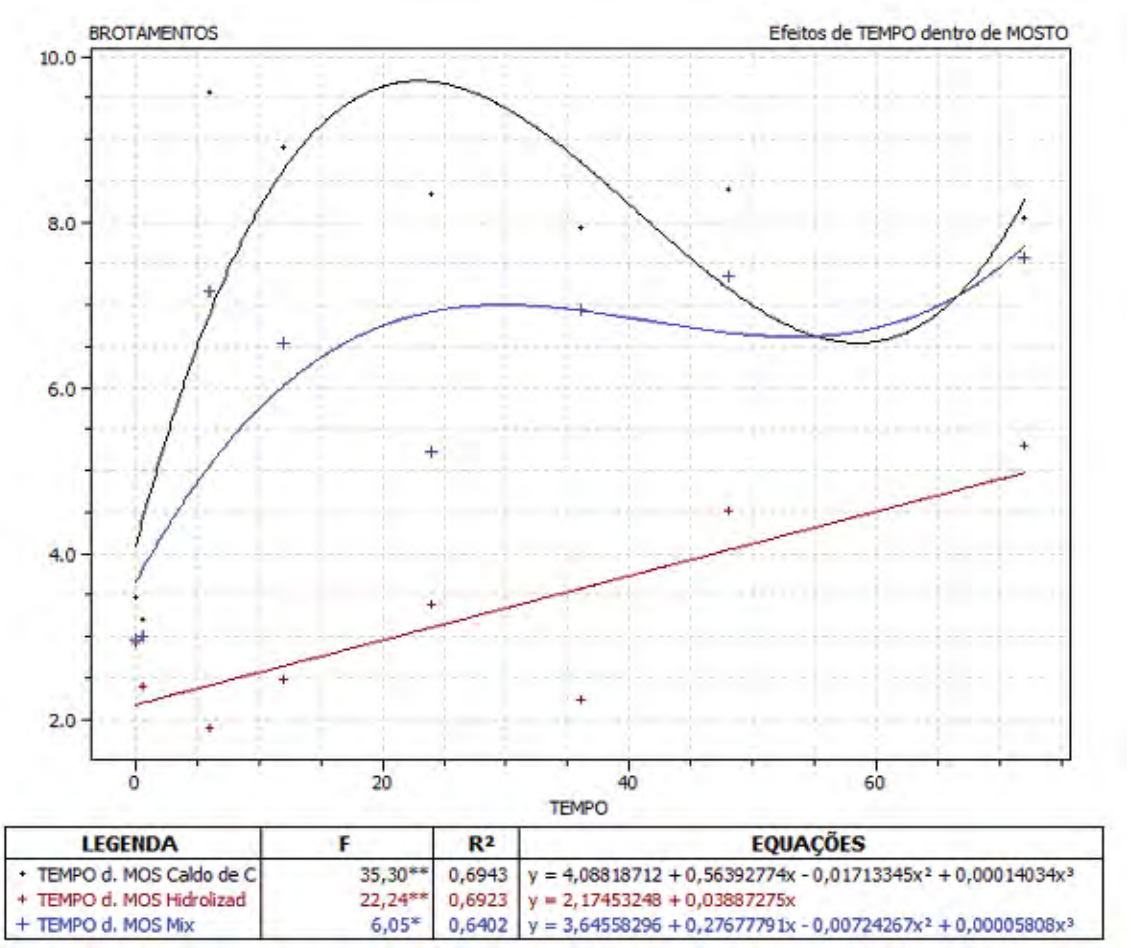
Considerando-se a viabilidade celular ao longo do período avaliado, a comparação entre as leveduras (figura 5), indicam que a levedura J10 apresentou um desempenho até 22% maior que a levedura FT858, que teve o menor desempenho ao final de 72 horas de fermentação. Este fato pode ser explicado pela natureza distintas das estirpes, uma vez a J10 evidencia capacidade para metabolizar de xilose que é o principal açúcar contido no mosto preparado a partir de hidrolisado hemicelulósico. A cepa FT858 é uma excelente fermentadora, entretanto não metaboliza pentoses. Cabe destacar que esta diferença foi de 62% maior a favor da J10 (figura 5).



LEGENDA	F	R²	EQUAÇÕES
TEMPO d. LEV J10	60,92**	0,8747	y = 88,8466205 - 0,17267236x
TEMPO d. LEV FT858	8,29**	0,9826	y = 85,8977386 - 0,02156993x - 0,01888979x² + 0,00018257x³
TEMPO d. LEV Mix	244,48**	0,9500	y = 87,7028381 - 0,34590741x

Figura 5. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para viabilidade celular da levedura (%) J10, FT858 e a mistura da J10 com FT858. Jaboticabal-SP, 2012.

Os resultados obtidos para o brotamento foram maiores para o mosto de caldo de cana, enquanto o pior desempenho foi observado para o mosto de hidrolisado hemicelulósico (figura 6). A porcentagem ideal de brotamentos em um processo fermentativo deve variar entre 5 a 15%, de acordo com AMORIM *et al.*, (1996). Neste caso apenas o mosto de hidrolisado hemicelulósico não proporcionou o resultado recomendado que foram da ordem de 3,67% em média.



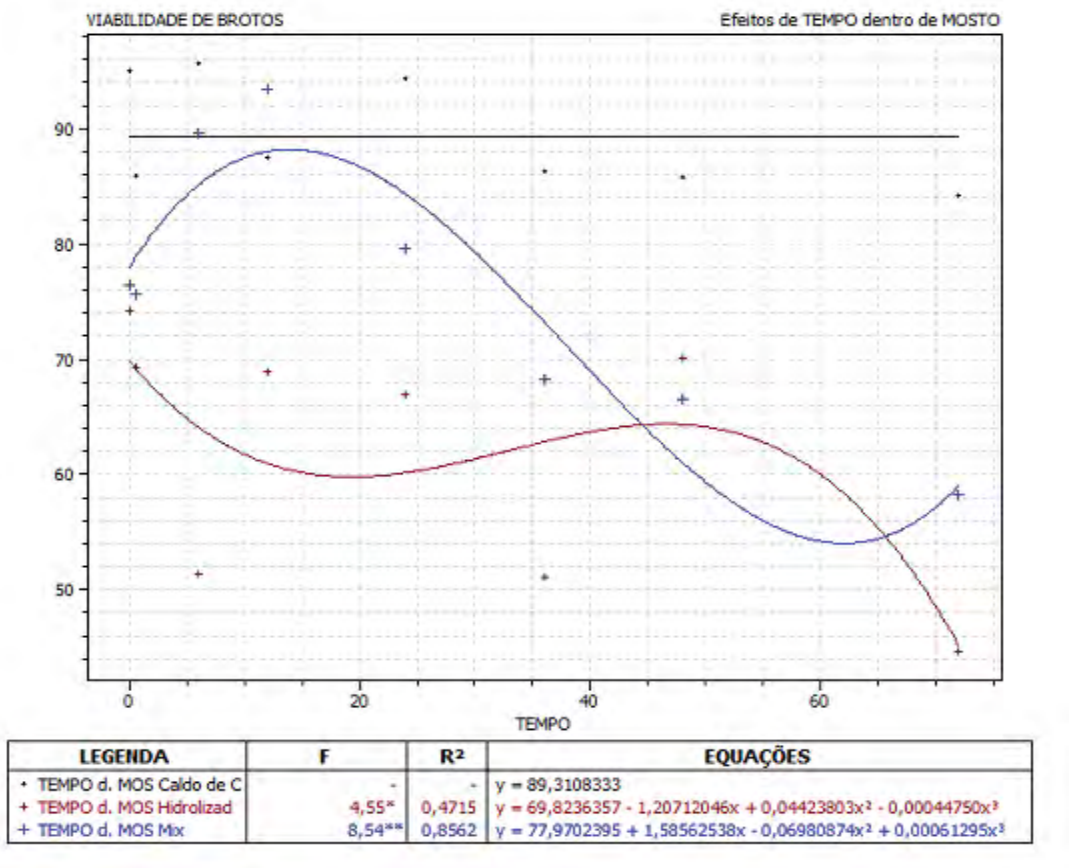
LEGENDA	F	R²	EQUAÇÕES
TEMPO d. MOS Caldo de C	35,30**	0,6943	y = 4,08818712 + 0,56392774x - 0,01713345x² + 0,00014034x³
TEMPO d. MOS Hidrolizad	22,24**	0,6923	y = 2,17453248 + 0,03887275x
TEMPO d. MOS Mix	6,05*	0,6402	y = 3,64558296 + 0,27677791x - 0,00724267x² + 0,00005808x³

Figura 6. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para brotamentos (%) do mosto de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2012.

Quando se comparou as estipes estudadas, observou-se que para o mosto produzido a partir de caldo de cana houve um melhor brotamento, enquanto para o mosto preparado a partir de hidrolisado hemicelulósico observou-se os menores

resultados. Em 48 e 60 horas de fermentação foi possível observar que o mosto preparado a partir da mistura de hidrolisado hemicelulósico + caldo de cana, houve um brotamento superior ao obtido para o mosto de caldo de cana.

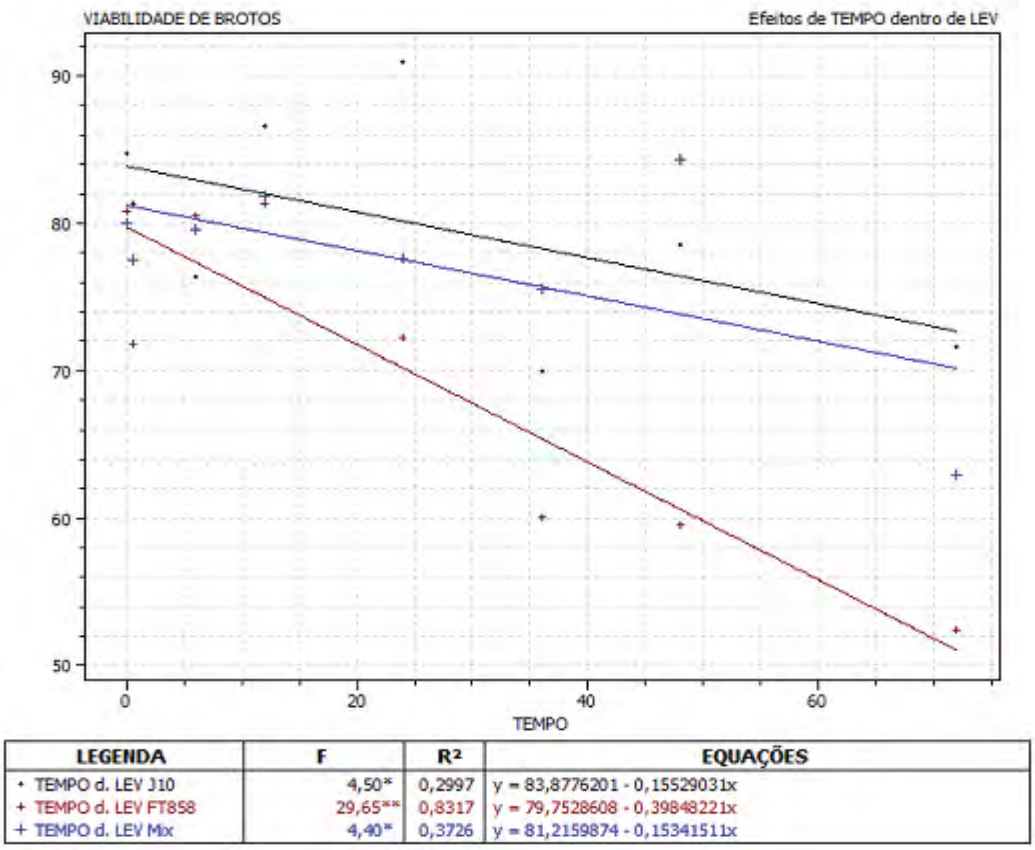
Para a fermentação realizada a partir do mosto de caldo de cana, a viabilidade de brotos manteve-se ao longo do período estudado. Entretanto observou-se diferenças significativas quando se utilizou os mostos obtidos do hidrolisado e a mistura. Pode-se destacar que até 48 horas de fermentação, o mosto de hidrolisado hemicelulósico apresentou uma viabilidade de brotos superior à do mosto da mistura de hidrolisado + caldo (figura 7). Neste caso observa-se a quantidade maior de xilose contida neste mosto, que tem uma assimilação mais lenta do que a glicose, pode ter influenciado este comportamento.



LEGENDA	F	R²	EQUAÇÕES
TEMPO d. MOS Caldo de C	-	-	y = 89,3108333
TEMPO d. MOS Hidrolizad	4,55*	0,4715	y = 69,8236357 - 1,20712046x + 0,04423803x² - 0,00044750x³
TEMPO d. MOS Mix	8,54**	0,8562	y = 77,9702395 + 1,58562538x - 0,06980874x² + 0,00061295x³

Figura 7. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para viabilidade de brotos (%) do mosto de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2012.

Comparando-se as estipes de leveduras observou-se um melhor desempenho para a J10 e para a mistura da J10 + FT858 (figura 8). A estirpe FT858 é utilizada industrialmente na fermentação de mosto que contém essencialmente hexoses, por esse motivo, seu desempenho em mostos que contém grande quantidade de pentoses, não foi positivo.



LEGENDA	F	R²	EQUAÇÕES
· TEMPO d. LEV J10	4,50*	0,2997	y = 83,8776201 - 0,1552903 1x
+ TEMPO d. LEV FT858	29,65**	0,8317	y = 79,7528608 - 0,3984822 1x
+ TEMPO d. LEV Mix	4,40*	0,3726	y = 81,2159874 - 0,1534151 1x

Figura 8. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para viabilidade de brotos (%) das leveduras J10, FT858 e a mistura da J10 com FT858. Jaboticabal-SP, 2012.

Deve-se considerar ainda que à medida que a fermentação é realizada, aumenta a concentração de etanol no momento que pode ser um fator limitante para o metabolismo do microrganismo (TOIVARI *et. al.,* 2001). O teor de etanol aliado a concentração de compostos fenólicos e ácidos, quantificados nesta pesquisa, podem ter sido determinantes para a menor produção de etanol.

4.4. Metabolismo de açúcares

A figura 9 apresenta o consumo de açúcares totais ao longo das 72 horas de fermentação. Segundo SCHIRMER-MICHEL *et al.,* (2008), nas primeiras 24 hs de cultivo as hexoses são esgotadas, seguidas por pentoses, este fato é resultante da glicose ser fonte de carbono universal. O rápido consumo de glicose também já foi observado em hidrolisados de bagaço de cana (CHENG *et al.,* 2008). O consumo de xilose (principal açúcar do mosto do hidrolisado hemicellulósico) no entanto não foi total, estabilizando-se a partir de 24 horas (KÖTTER; CIRIACY, 1993). De acordo com o sistema de transporte de monossacarídeos em *S. cerevisiae* tem uma afinidade cerca de 200 vezes mais baixa para xilose do que para glucose. Este comportamento provavelmente pode explicar este fato. Entretanto cabe destacar que novos estudos deverão ser realizados para esta confirmação.

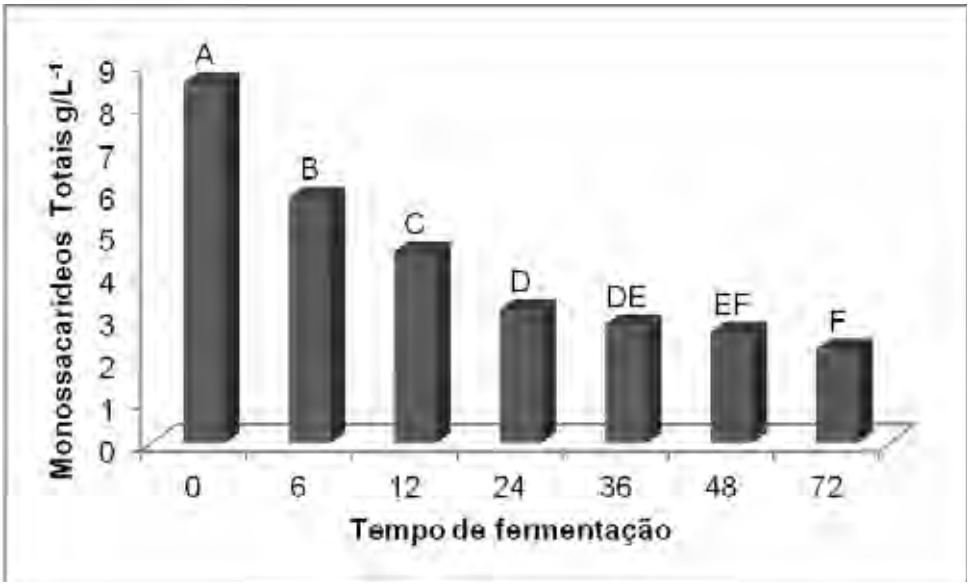
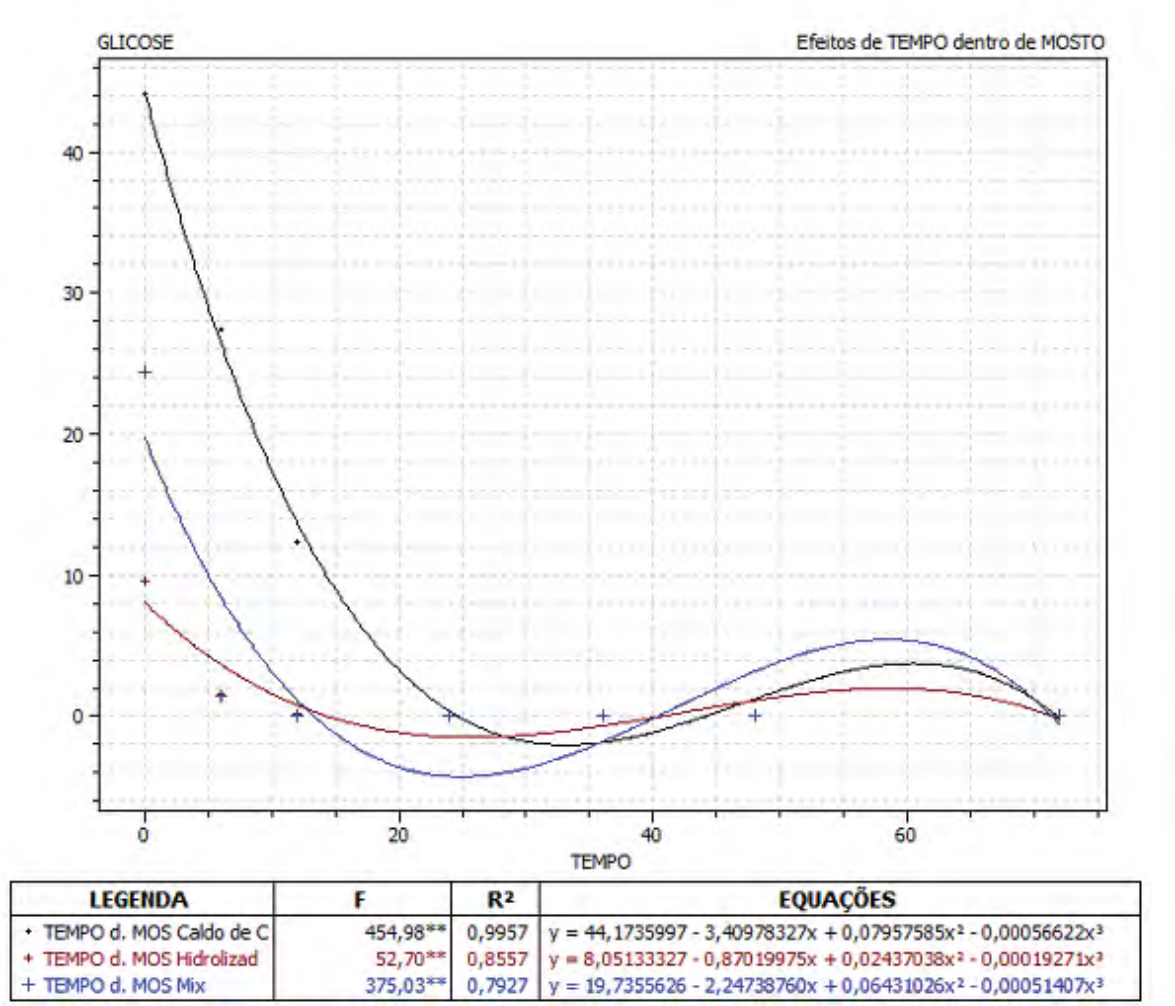


Figura 9. Resultados médios do consumo de açúcares totais para os mostos e leveduras ao longo de 72 horas de fermentação. Jaboticabal-SP, 2012.

.

O consumo de glicose apresentado pelas estirpes de leveduras ao longo de 72 horas de fermentação (figura 10). Confirma que esta é a fonte de carboidratos preferencial das leveduras. Verifica-se que no mosto de caldo de cana a glicose representa cerca de 47,6%, enquanto no mosto de hidrolisado, 11,8% e no mosto de hidrolisado + caldo de cana cerca de 37,9% em média.

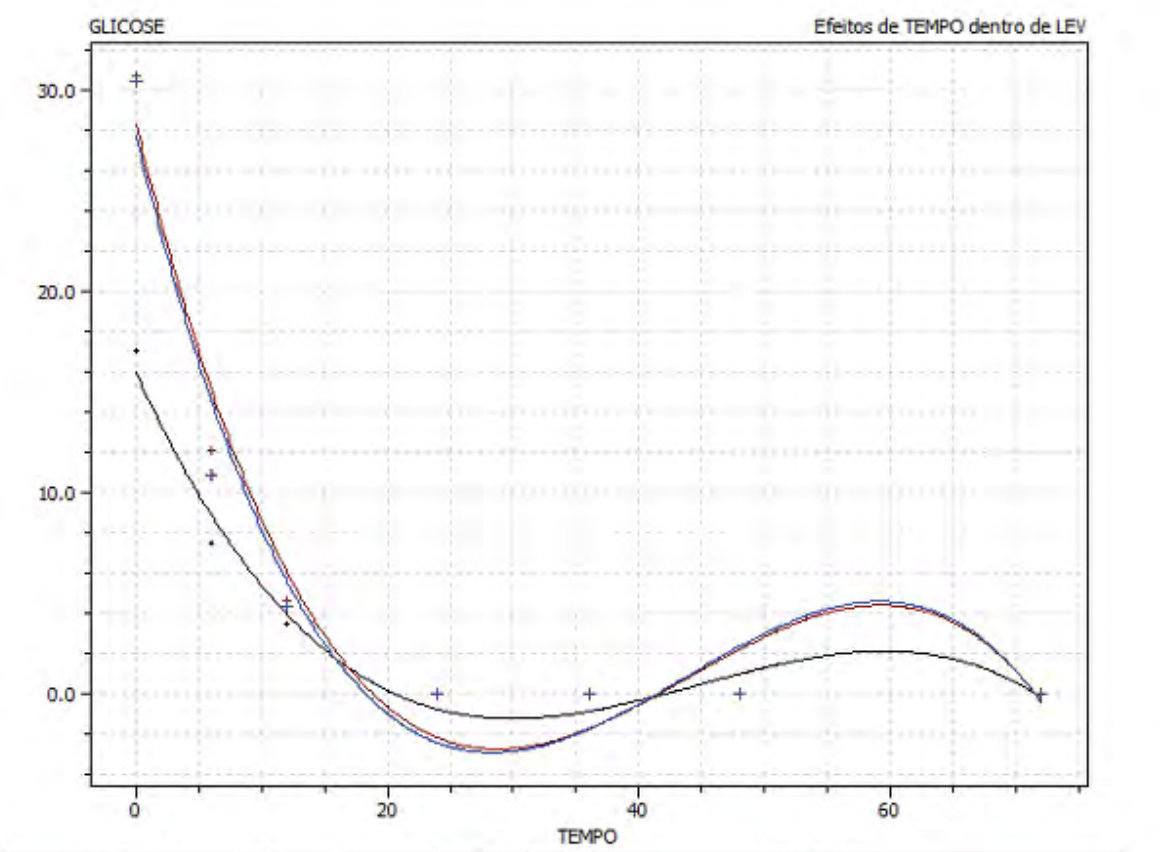


LEGENDA	F	R²	EQUAÇÕES
TEMPO d. MOS Caldo de C	454,98**	0,9957	y = 44,1735997 - 3,40978327x + 0,07957585x² - 0,00056622x³
TEMPO d. MOS Hidrolizad	52,70**	0,8557	y = 8,05133327 - 0,87019975x + 0,02437038x² - 0,00019271x³
TEMPO d. MOS Mix	375,03**	0,7927	y = 19,7355626 - 2,24738760x + 0,06431026x² - 0,00051407x³

Figura 10. Representação gráfica da regressão polinomial para glicose (g/L) nos mostos de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2013.

A curva de consumo de glicose apresentada na figura 10 representa um valor médio calculado para os três inóculos avaliados, ou seja, uma média entre a J10, FT858 e J10 + FT858. A J10 é uma cepa que apresenta habilidade para o desdobramento de outros açúcares, o que pode ter interferido sobre o consumo da glicose.

A figura 11 apresenta o consumo de glicose ao longo de 72 horas de fermentação para as estirpes de leveduras. Observa-se que os tratamentos com a FT858, quando isolada ou em conjunto com a J10, tem um melhor desempenho, por ser naturalmente metabolizadora de hexoses.



LEGENDA	F	R²	EQUAÇÕES
• TEMPO d. LEV J10	94,48**	0,9776	y = 15,9818999 - 1,38066375x + 0,03463983x² - 0,00025802x³
+ TEMPO d. LEV FT858	359,91**	0,9627	y = 28,2865324 - 2,57519791x + 0,06649924x² - 0,00050360x³
+ TEMPO d. LEV Mix	371,12**	0,9507	y = 27,6920634 - 2,57150897x + 0,06711742x² - 0,00051138x³

Figura 11. Representação gráfica da regressão polinomial para glicose (g/L) nas leveduras J10, FT858 e a mistura da J10 com FT858. Jaboticabal-SP, 2013.

Avaliando-se o consumo de xilose ao longo da fermentação (figura 12) observa-se um consumo linear da xilose ao longo do tempo. Entretanto este alcançou em média 67,63% não se esgotando totalmente. Este comportamento pode ser resultado da grande proporção de outros compostos que estavam contidos

neste meio, que podem ter afetado negativamente o metabolismo das leveduras, impossibilitando o consumo dos açúcares.

TOIVARI *et al.,* (2001) estudando a conversão de xilose a etanol, quando se utilizando a levedura *S. cerevisae,* recombinante constatou que a concentração residual foi ao redor de 10g/L, devido à uma limitação no metabolismo desse microrganismo.

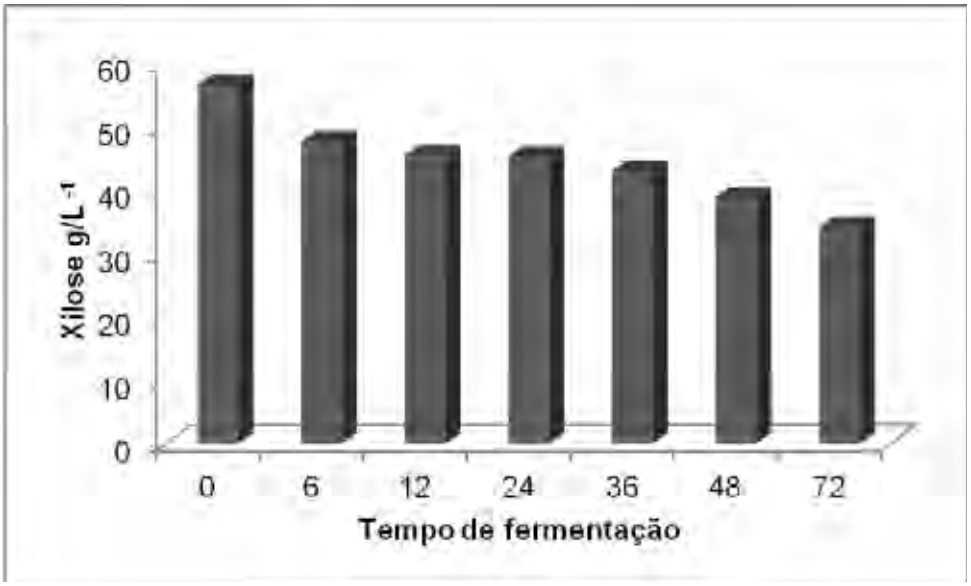


Figura 12. Resultados médios do consumo de xilose no mosto de hidrolisado hemicelulósico para os inóculos avaliadosao longo de 72 horas de fermentação, Jaboticabal-SP, 2012.

O consumo de arabinose ao longo do tempo foi em média de 20,16% (figura 13). Este açúcar é obtido no hidrolisado hemicelulósico, numa proporção de aproximadamente 15,4% no total dos açúcares presentes no mosto

De acordo com SHI *et al.,* (2000) a via de assimilação de arabinose por leveduras é bastante similar à da xilose. A arabinose, assim como a xilose está diretamente envolvida no metabolismo de pentoses por leveduras, sendo considerada, juntamente com a xilose como principais responsáveis pela ativação das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase em *Candida tenuis* (KERN *et. al.,* 1997).

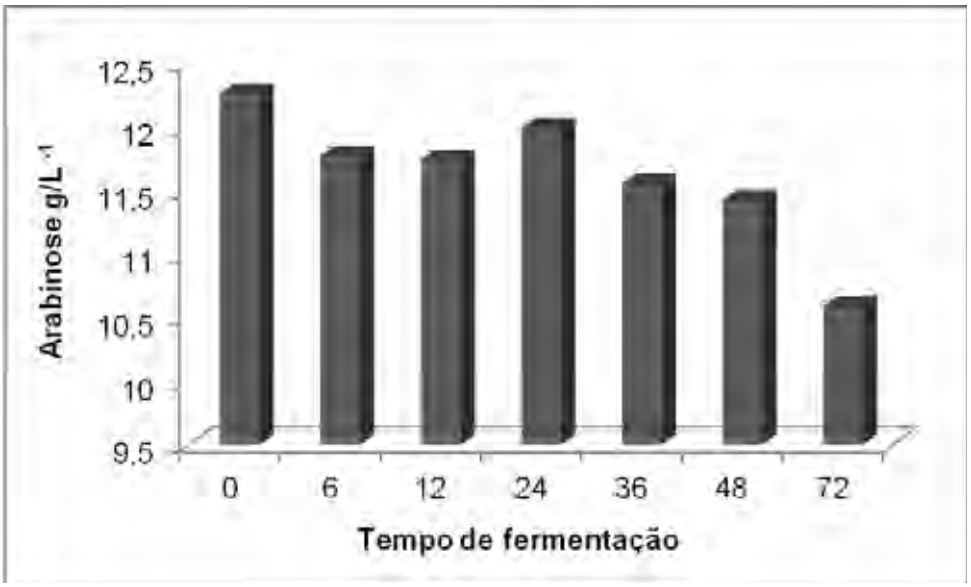


Figura 13. Resultados médios do consumo de arabinose no mosto de hidrolisado para os inóculos avaliados hemicelulósico ao longo de 72 horas de fermentação, Jaboticabal-SP, 2012.

4.5. Processo fermentativo

Os resultados obitdos para Brix e pH durante o processo fermentativo empregando-se mostos de Caldo de cana, Hidrolisado Hemicelulósico e Caldo de cana mais Hidrolisado Hemicelulósico com as cepas J10, FT858 e J10 mais FT858, ao longo de 72 horas de fermentação estão apresentados na tabela 2.

Pode-se observar que o Brix do mosto de caldo de cana foi o que apresentou maior redução, resultante da maior utilização dos açúcares disponíveis pelas leveduras. O comportamento do Brix para os mostos e leveduras ao longo do período estudado (figura14), evidenciam que o consumo do substrato no mosto de caldo é mais acentuado em comparação aos demais. Cabe destacar ainda o desempenho evidenciado para o Brix do hidrolisado. Provavelmente este parâmetro não foi muito eficiente para acompanhar o metabolismo dos açúcares pelos micro-organismos.

O pH do mosto de caldo de cana foi o menor e ao longo de 72 horas de fermentação, apresentando redução estatisticamente significativa (tabela 2). O pH ao longo do tempo, entre mostos e leveduras, estão apresentados na figura 15.

Tabela 2. Resultados médios obtidos para da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para para as Brix e pH, empregando-se mostos de caldo de cana, hidrolisado hemicelulósico e caldo de cana mais hidrolisado hemicelulósico com as leveduras J10, FT858 e J10 mais FT858. Jaboticabal-SP, 2012.

Causas de Variação	Brix (%)	pH
Mosto		
Caldo de cana	6,68 C	3,32 C
Hidrolisado hemicelulósico	13,70 A	4,06 A
Caldo de cana + hidrolisado hemicelulósico	9,79 B	3,87 B
TF	1412,30**	511,83**
dms (5%)	0,3697	0,0671
C.V.	8,528	4,1451
Leveduras		
J10	9,86 B	3,77 A
FT858	10,21 A	3,72 C
J10 + TF858	10,10 A	3,76 B
TF	24,77**	51,34**
dms (5%)	0,1297	0,0135
C.V.	3,2733	0,911
Período de incubação (horas)		
0	14,21 A	4,11 A
6	11,39 B	3,74 B
12	10,19 C	3,73 B
24	8,88 D	3,61 C
36	8,71 DE	3,53 D
48	8,566 EF	3,76 B
72	8,47 F	3,80 B
TF	1860,17**	97,86**
dms (%)	0,2078	0,0777
C.V.	2,9342	2,9394
Interação		
A X B X C	$0,63^{ns}$	$0,35^{ns}$

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, ns = não significativo, ** = significativo 1% de probabilidade, dms = diferença mínima significativa, C.V. = coeficiente de variação.

Pode-se observar que apenas o mosto de caldo de cana atingiu a um nível de Brix esperado, ou seja, queda acentuada ao longo do período de fementação. O Brix é a quantidade significativa de sólidos solúveis contidos no meio, sendo que grande parte desses sólidos são açúcares. Portanto, pelo fato do mosto de hidrolisado hemicelulósico conter grande quantidade de xilose, que não foi consumida ao longo do tempo, resultando em elevado valor do Brix alto mesmo ao final de 72 horas de fermentação.

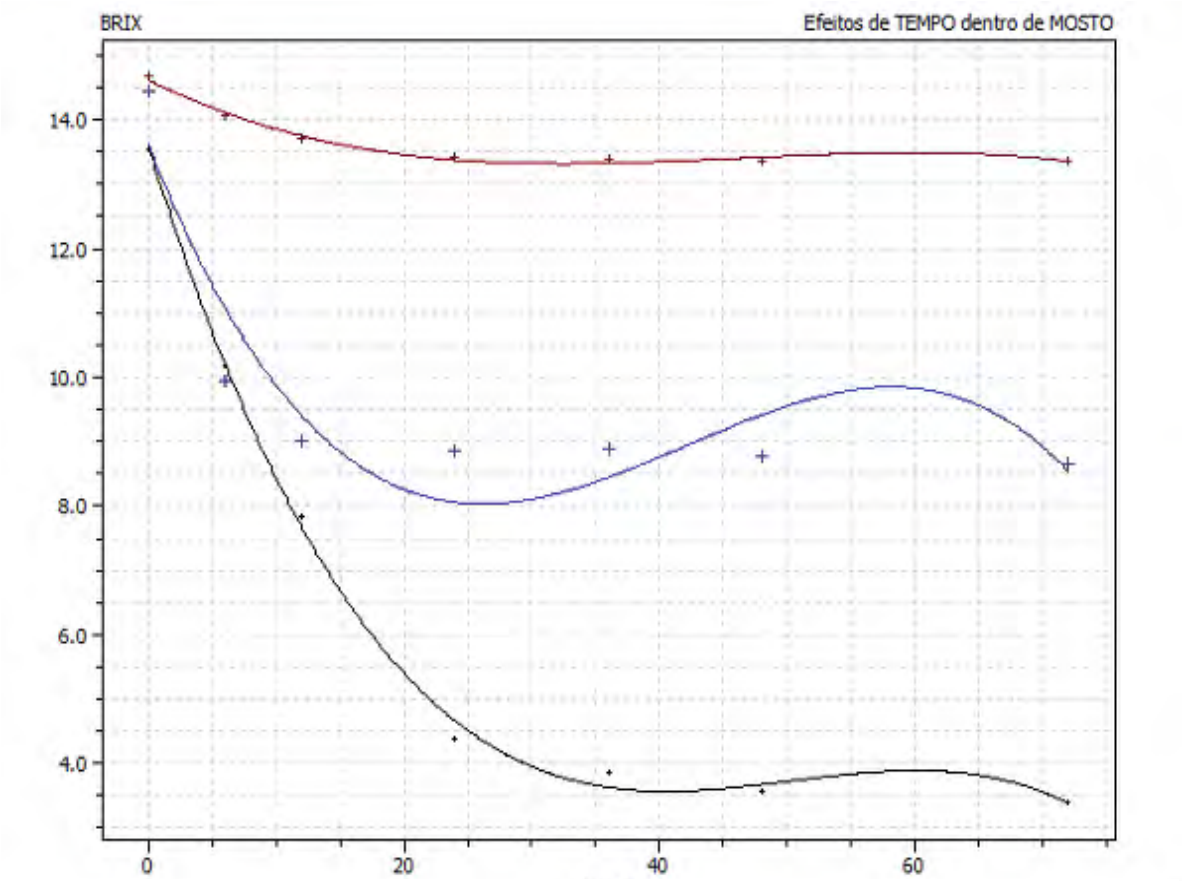
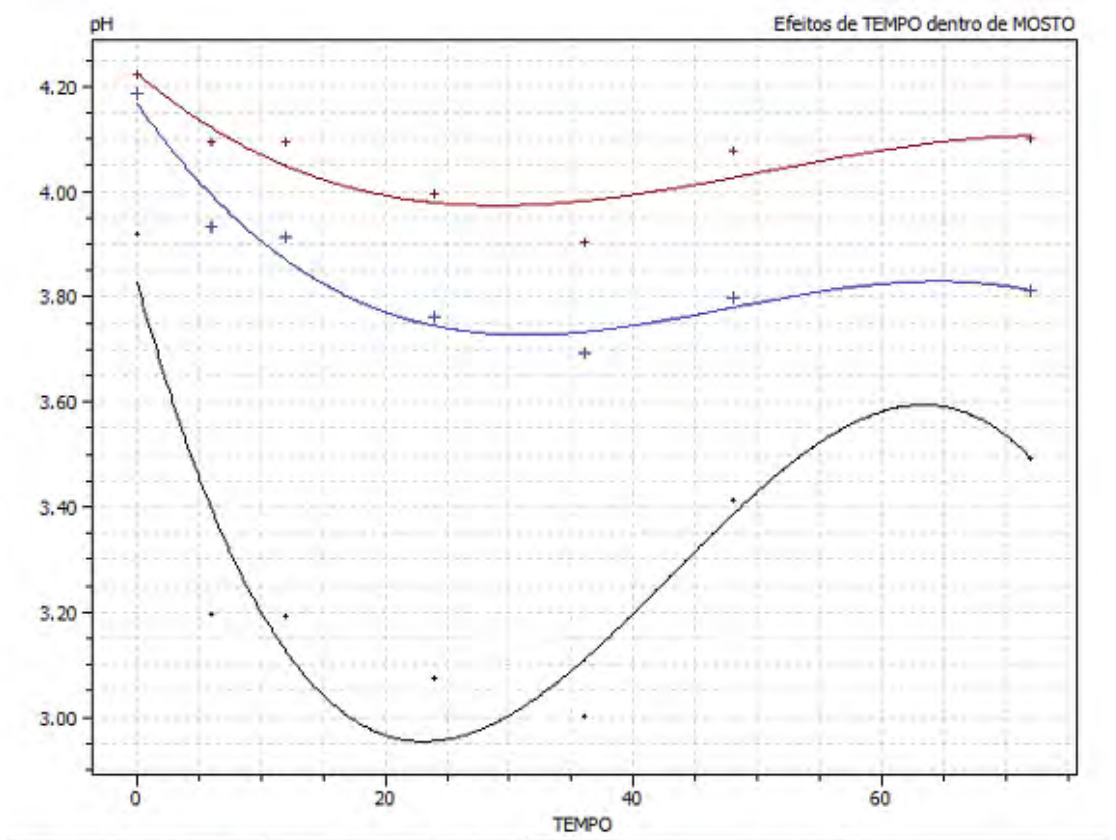


Figura 14. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para Brix (%) nos mostos de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2012.

O pH varia durante a fermentação como resultados de produção de ácidos pelas próprias leveduras, ou por microrganismos contaminantes da fermentação. Observou-se que para o mosto de caldo de cana houve uma maior variação, que pode ser explicada pela provavel presença de contaminantes.



LEGENDA	F	R²	EQUAÇÕES
TEMPO d. MOS Caldo de C	190,92**	0,8651	y = 3,82721521 - 0,08611799x + 0,00254357x² - 0,00001961x³
TEMPO d. MOS Hidrolizad	4,88*	0,7961	y = 4,22467063 - 0,01994733x + 0,00047998x² - 0,00000314x³
TEMPO d. MOS Mix	15,23**	0,9491	y = 4,16732011 - 0,03353970x + 0,00079610x² - 0,00000554x³

Figura 15. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para pH nos mostos de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2012.

A tabela 3 apresenta os valores obtidos para Acidez total e Glicerol do vinho após as 72 horas de fermentação. Da sua análise observa-se que o mosto de hidrolisado hemicelulósico foi o que aprensentou maior acidez total, resultante do processo de obtenção do hidrolisado que se dá através de hidrólise ácida.

Tabela 3. Resultados médios obtidos para da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para as análises de Acidez e Glicerol, empregando-se mostos de caldo de cana, hidrolisado hemicelulósico e caldo de cana mais hidrolisado hemicelulósico com as leveduras J10, FT858 e J10 mais FT858. Jaboticabal-SP, 2012.

Causas de variação	Acidez (g H_2SO_4/L)	Glicerol (mg/100mL)
Mosto		
Caldo de cana	1,65 B	0,81 B
Hidrolisado hemicelulósico	7,02 A	0,55 C
Caldo de cana + Hidrolisado hemicelulósico	6,25 A	1,00 A
TF	154,47 **	70,81**
dms (5%)	0,92	0,1041
C.V.	16,27	11,52
Leveduras		
J10	4,83 A	0,79 A
FT858	5,04 A	0,80 A
J10 + TF858	5,05 A	0,77 A
TF	2,32 ^{ns}	2,20 ^{ns}
dms (5%)	0,29	0,03
C.V.	5,70	4,82
Interação		
A x B	4,99 **	8,71 **

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, ns = não significativo, ** = significativo 1% de probabilidade, dms = diferença mínima significativa, C.V. = coeficiente de variação.

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

A maior produção de glicerol foi observada no mosto composto por hidrolisado hemicelulósico mais caldo de cana. Entre as estirpes de leveduras, não houve diferença significativa pra esses parâmetros.

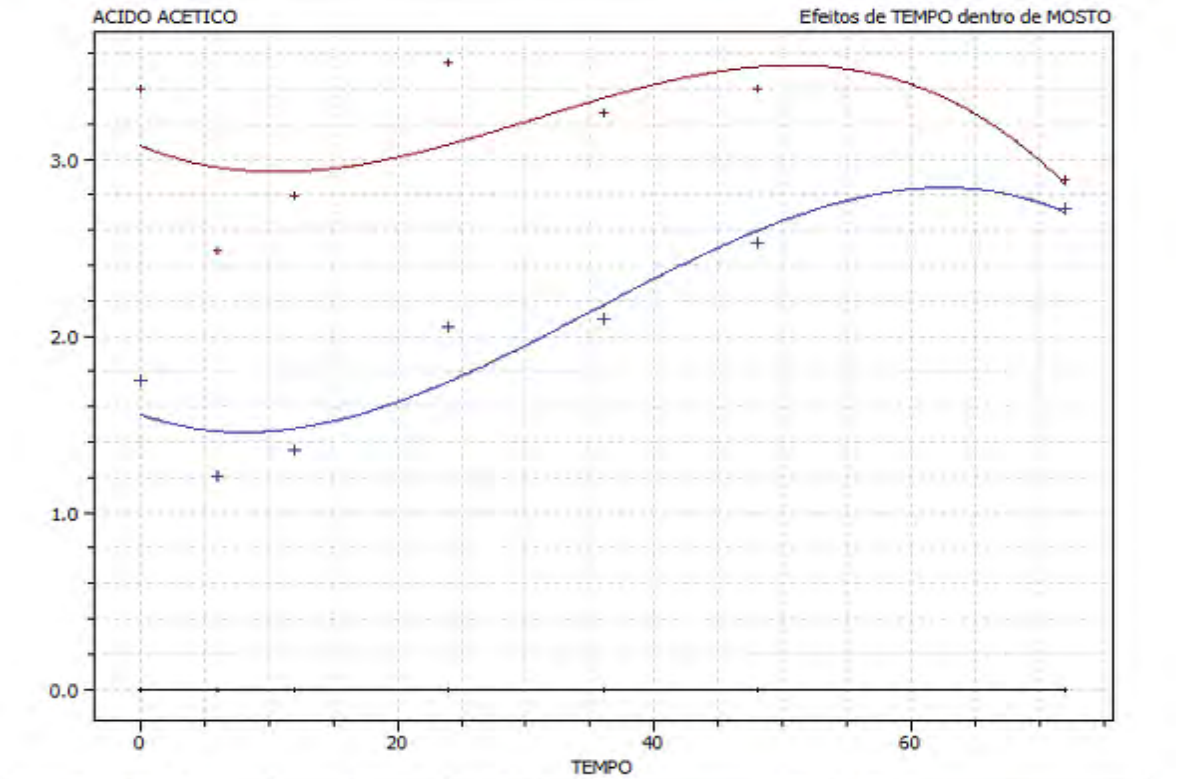
A tabela 4 apresenta os valores médios obtidos para ácido acético, xilitol e etanol entre mostos, leveduras e ao longo de 72 horas de fermentação.

Tabela 4. Resultados médios obtidos para da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para as análises de as Ácido acético, Xilitol e Etanol no vinho, empregando-se mostos de caldo de cana, hidrolisado hemicelulósico e caldo de cana mais hidrolisado hemicelulósico com as leveduras J10, FT858 e J10 mais FT858. Jaboticabal-SP, 2012.

Causas de Variação	Ácido acetic no vinho (g/L)	Xilitol no vinho (g/L)	Etanol no vinho (g/L)
Mosto			
Caldo de cana	0,00 C	0,00 C	18,25 A
Hidrolisado hemicelulósico	3,11 A	1,65 A	5,24 C
Caldo de cana + hidrolisado hemicelulósico	1,95 B	0,22 B	15,59 B
TF	3298,11**	5599,44**	417,69**
dms (5%)	0,1081	0,0475	1,3276
C.V.	14,8534	17,5576	23,6419
Leveduras			
J10	1,67 A	1,01 A	11,98 B
FT858	1,76 A	0,43 B	12,58 B
J10 + TF858	1,63 A	0,43 B	14,53 A
TF	$2,57^{ns}$	378,73**	14,72**
dms (5%)	0,1540	0,0625	1,2520
C.V.	23,1416	25,2608	24,3903
Período de incubação (horas)			
0	1,71 AB	0,00 C	0,00 E
6	1,22 C	3,46 A	15,94 AB
12	1,38 BC	0,93 B	18,01 AB
24	1,86 A	0,00 C	18,46 A
36	1,78 A	0,00 C	15,22 BC
48	1,97 A	0,00 C	12,89 CD
72	1,86 A	0,00 C	10,70 D
TF	10,21**	3610,86**	82,40**
dms (%)	0,3674	0,0911	2,9596
C.V.	30,8951	20,6306	32,2637
Interação			
A X B X C	$1,09^{ns}$	403,21**	2,17**

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, ns = não significativo, ** = significativo 1% de probabilidade, dms = diferença mínima significativa, C.V. = coeficiente de variação.

A figura 16 apresenta o comportamento obtido para o Ácido acético ao longo de 72 horas de fermentação para mostos e leveduras estudadas.



LEGENDA	F	R²	EQUAÇÕES
TEMPO d. MOS Caldo de C	-	-	y =
TEMPO d. MOS Hidrolizad	7,61**	0,3749	y = 3,07825563 - 0,03008149x + 0,00170855x² - 0,00001851x³
TEMPO d. MOS Mix	6,46*	0,8819	y = 1,55643202 - 0,02579476x + 0,00180749x² - 0,00001706x³

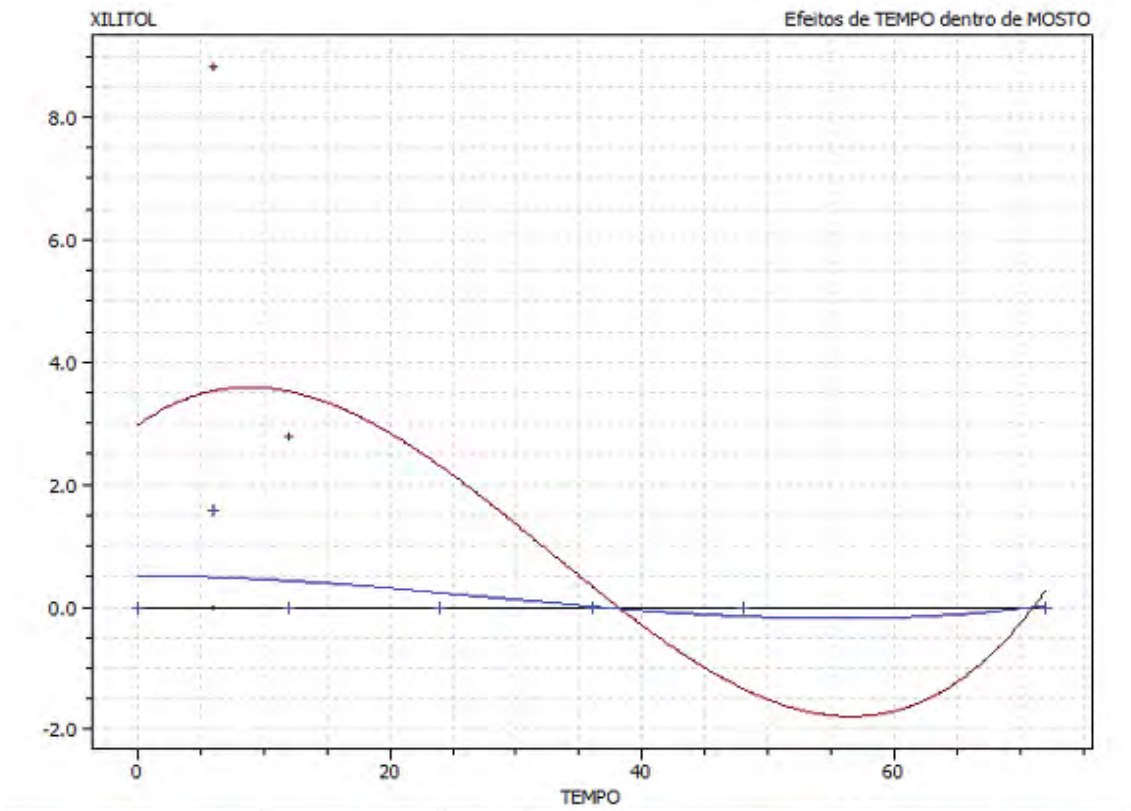
Figura 16 Representação gráfica da regressão polinomial calculada para ácido acético no vinho (g/L) nos mostos de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2012.

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

O aumento da concentração de ácido acético nos mostos de hidrolisado hemicelulósico e mosto de hidrolidado hemicelulósica + caldo de cana pode ter

ocorrido por ocasião da utilização do etanol como substrato pelas leveduras, pela conversão do etanol em acetaldeído, e este em acetato WALKER, (1998); ou em ácido acético por processos de oxidação. No mosto de caldo de cana não foi observada a produção de ácido acético.

Da análise das figuras 17 e 18 observou-se o comportamento da regressão polinomial calculada para o parâmetro xilitol presente no vinho ao longo do período estudado para mostos e leveduras.

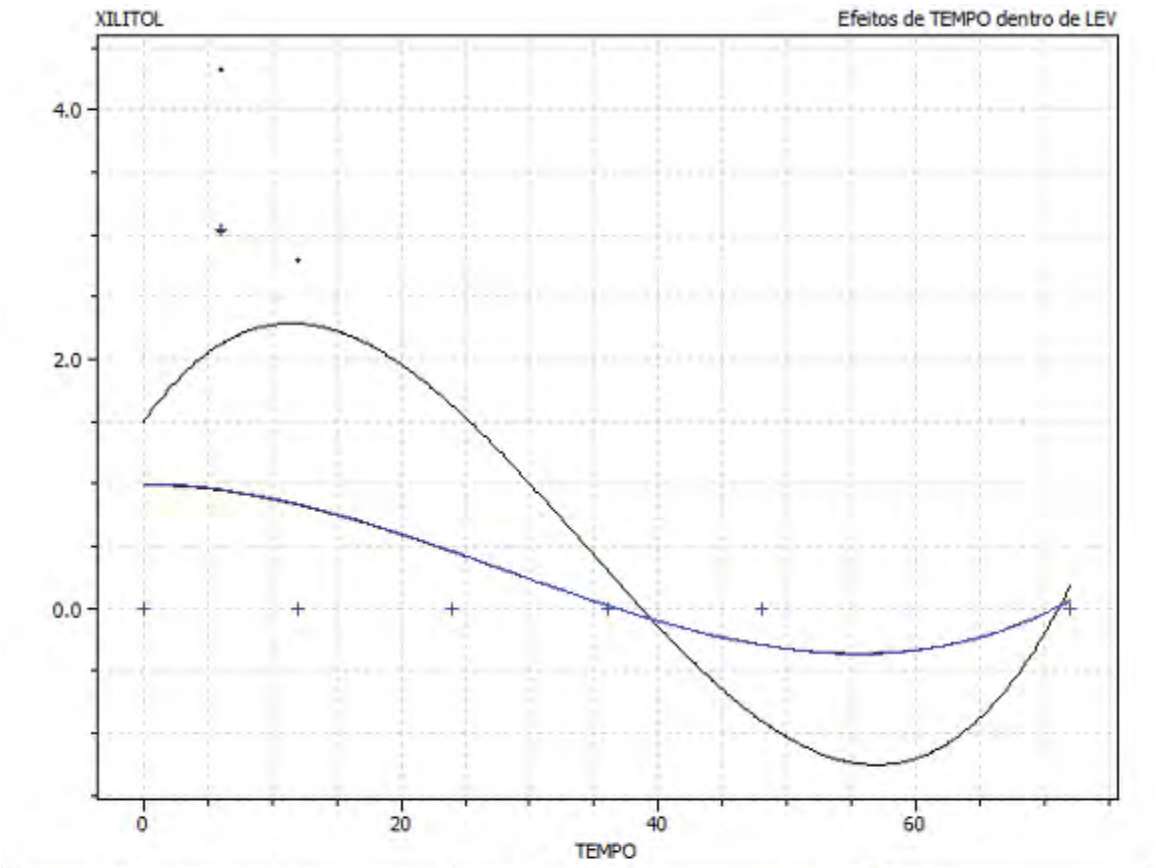


LEGENDA	F	R²	EQUAÇÕES
TEMPO d. MOS Caldo de C	-	-	y =
TEMPO d. MOS Hidrolizad	3523,17**	0,3279	y = 2,97282253 + 0,14779636x - 0,00969000x² + 0,00009882x³
TEMPO d. MOS Mix	24,27**	0,1991	y = 0,51501699 + 0,00011054x - 0,00068505x² + 0,00000820x³

Figura 17. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para xilitol no vinho (g/L) nos mostos de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2012.

A produção de xilitol é observada apenas para os mostos que continham na sua composição o hidrolisado hemicelulósico. Considerando-se as leveduras, observa-se que a J10 foi a que produziu a maior quatidade deste composto.

O xilitol é um produto intermediário da via de fermentação da xilose, sendo fonte de carbono para algumas espécies de leveduras, razão pela qual pode ter sido produzido no meio e consumido pelas leveduras para produção de etanol. As leveduras também, podem ter metabolizado os açúcares por diferentes vias metabólicas, produzindo o etanol a partir da glicose e o xilitol a partir da xilose.

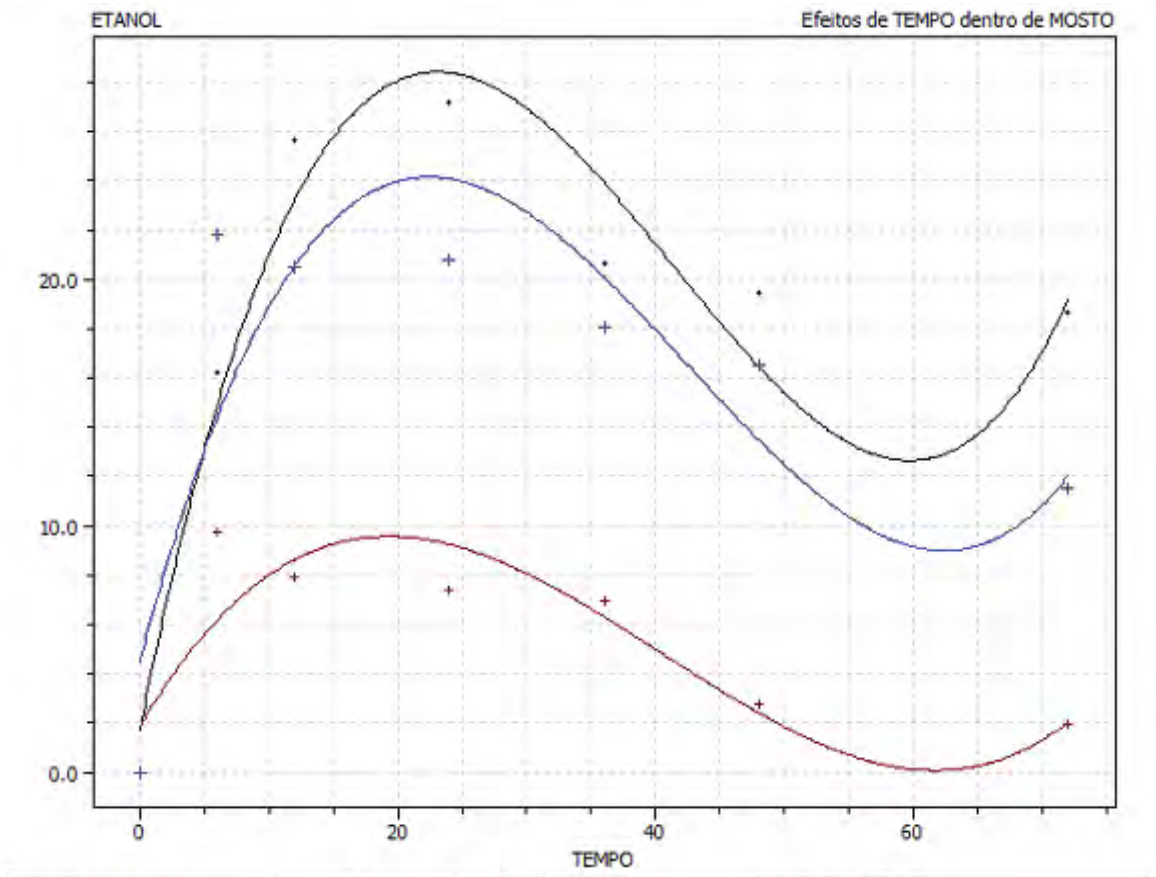


LEGENDA	F	R²	EQUAÇÕES
• TEMPO d. LEV J10	2049,05**	0,4329	y = 1,49980075 + 0,14748020x - 0,00773066x² + 0,00007536x³
+ TEMPO d. LEV FT858	89,72**	0,1991	y = 0,99027867 + 0,00021254x - 0,00131722x² + 0,00001577x³
+ TEMPO d. LEV Mix	91,09**	0,1991	y = 0,99776010 + 0,00021415x - 0,00132717x² + 0,00001589x³

Figura 18. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para xilitol no vinho (g/L) nas leveduras J10, FT858 e a mistura da J10 com FT858. Jaboticabal-SP, 2012.

Avaliando-se a produção de etanol no vinho observou-se que utilizando-se os maiores teores foram produzidos para o mosto de caldo de cana (figura 19), seguido pelo mosto composto por caldo de cana mais hidrolisado hemicelulósico. Este

resultado pode ser considerado positivo, quando comparado com os teores determinados no mosto de hidrolisado hemicelulósico, que foram até 77% menores. Este comportamento pode ser explicado pela composição dos mostos (quadro 3), quando se observou elevado teor de compostos inibidores no hidrolisado heimcelulósico, que não foram eficiêntemente removidos pelo processo de destoxificação.



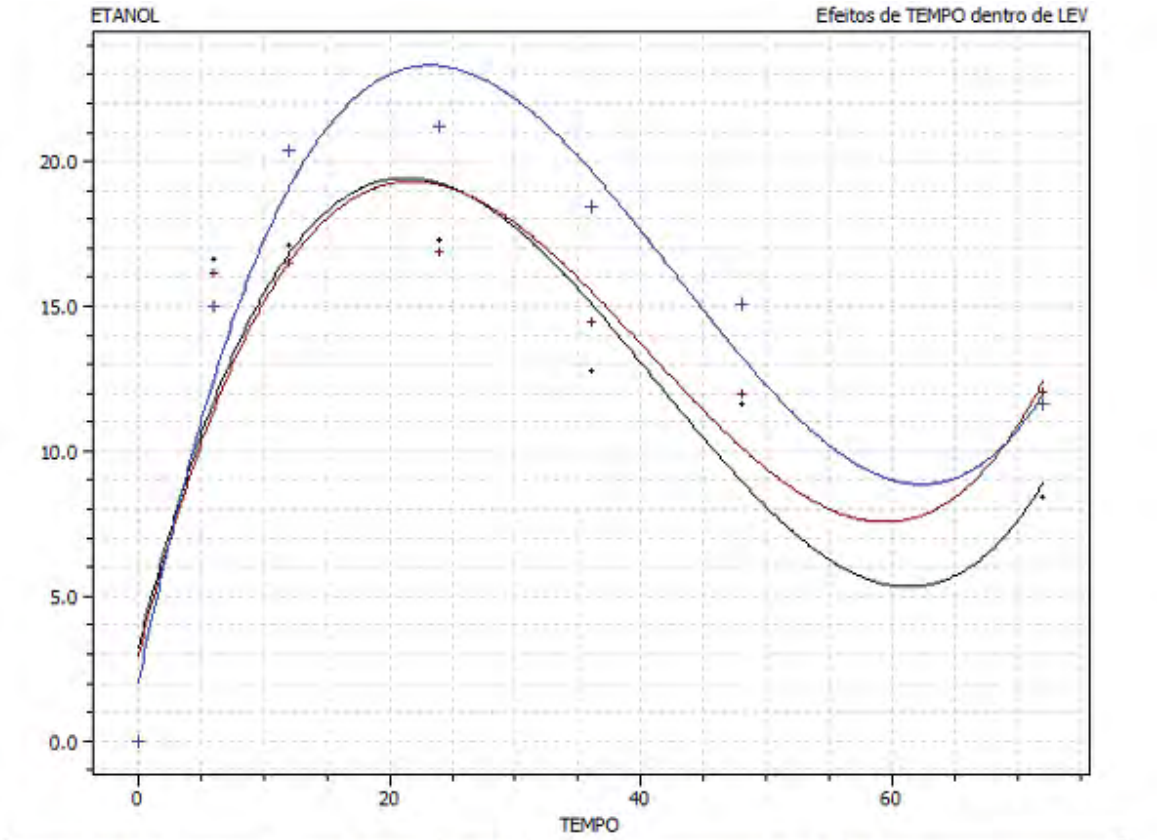
LEGENDA	F	R²	EQUAÇÕES
• TEMPO d. MOS Caldo de C	140,30**	0,9326	y = 1,76297519 + 2,64961172x - 0,07955317x² + 0,00064029x³
+ TEMPO d. MOS Hidrolizad	21,26**	0,7394	y = 1,88482612 + 0,89037322x - 0,03028301x² + 0,00024926x³
+ TEMPO d. MOS Mix	76,50**	0,7205	y = 4,56067590 + 1,98521945x - 0,06017746x² + 0,00047282x³

Figura 19. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para etanol no vinho (g/L) nos mostos de caldo de cana, mosto de hidrolisado hemicelulósico e a mistura de mosto de caldo de cana com mosto de hidrolisado hemicelulósico. Jaboticabal-SP, 2012.

A produção de etanol neste estudo foi positiva, pois embora tenha apresentado um rendimento inferior quando comparado às produções obtidas a partir de caldo de cana. Por outro lado quando comparada com resultados obtidos

por FUGITA, (2010), o rendimento chegou a ser 16% maior, quando utilizou-se a levedura J10 em hidrolisado concentrado.

A concentração final de etanol varia de acordo com a concentração de açúcares, nutrientes, contaminantes e inibidores contidas no mosto. Neste contexto, verificou-se que apenas ama única operação de destoxificação não foi suficiente para a remoção de ácidos e de compostos fenólicos, que influenciaram negativamente a produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico.



LEGENDA	F	R²	EQUAÇÕES
TEMPO d. LEV J10	66,22**	0,7782	y = 3,22384770 + 1,72234244x - 0,05450390x² + 0,00043988x³
TEMPO d. LEV FT858	66,41**	0,8009	y = 2,95831379 + 1,70984555x - 0,05364865x² + 0,00044052x³
TEMPO d. LEV Mix	79,49**	0,9318	y = 2,02631572 + 2,09301640x - 0,06186108x² + 0,00048196x³

Figura 20. Representação gráfica da regressão polinomial calculada para etanol no vinho (g/L) nas leveduras J10, FT858 e a mistura da J10 com FT858. Jaboticabal-SP, 2012.

Avaliando-se a microbiota do processo fermentativo, observou-se que entre as estirpes de leveduras não houve diferença estatisticamente significativa (tabela 7)

mostrando que elas podem ser utilizadas no processo produtivo tanto isoladas, como em cocultura. Deve-se destacar também o desempenho das estirpes estudadas no desdobramento de hexoses e pentoses, que podem ser considerados positivos, levando-se em consideração as condições experimentais.

5. CONCLUSÕES

No mosto de caldo de cana foi observado maior produção de etanol quando comparado com o mosto de hidrolisado hemicelulósico.

A viabilidade celular, viabilidade de brotos e o brotamento sempre foram maiores em mosto de caldo de cana. Entre as leveduras os valores mais elevados foram obtidos pela linhagem J10.

O processo de destoxificação utilizado promoveu uma remoção parcial de ácidos e composto fenólicos.

A utilização de coculturas de microrganismos foi mais eficiente na produção de etanol em relação as culturas individuais.

O hridrolisado hemicelulósico apresentou baixa eficiência na produção de etanol (11,4% em média).

6. REFERÊNCIAS

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.G. **Processos de produção de álcool – controle e monitoramento.** Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 93p. 1996.

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

AMORIM, H. V. de **Quanto custa selecionar uma levedura industrial**?, palestra apresentada na V Semana de Fermentação Alcoólica “Jayme Rocha de Almeida” ESALQ / USP 19 e 20 de Maio / 2011.

ANP - **Agência Nacional de Petróleo**, Disponível em: <www.anp.gov.br>. Acesso em: 10 dez. 2012.

ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA e SILVA, J. B.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotecnology**, v. 70-72, p.89-98, 1998.

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

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

ARRUDA P. V.; FELIPE M. G. A. Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii***. Current Microbiology**, v. 58, p.274-278, 2009.

ARRUDA, P. V. **Avaliação do processo biotecnológico de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011, 165f, Tese de Doutorado - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

BARBOSA, J.C.; MALDONADO JÚNIOR, W. Software AgroEstat - **Sistema de análises estatísticas de ensaios agronômicos.** Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, 2011.

BADER, J.; MAST-GERLACH, E.; POPOVIC, M.K.; BAJPAI, R.; STAHL. U.Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology,** v. 109, p. 371 – 387, 2009.

BRAUNBECK, O. A.; MAGALHÃES, P. S. G. **Seguimento do perfil do solo no corte e/ou levantamento de produtos agrícolas rasteiros.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.6, n.1, p.151-158, Campina Grande, PB, 2002.

CAMARGO, P. D. Força verde: um novo campo para a indústria química. **Revista Brasileira de Engenharia Química,** p. 18-21, agosto 2005.

CAMARGO, P. D. Força verde: um novo campo para a indústria química**. Revista Brasileira de Engenharia Química**, p. 18-21, 2007.

CANILHA, L.; CARVALHO, W. ; FELIPE, M. G. A. ; ALMEIDA E SILVA, J.B. ; GIULIETTI, M. Ethanol production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate Using *Pichia stipitis*. **Applied Biotechnology,** n. 161, p.84-92, 2010.

CGEE, Bioetanol Combustível: uma oportunidade para o Brasil., Centro de Gestão e Estudos estratégicos –, 536p. Brasília – DF, 2009.

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

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

CONAB - Companhia Nacional De Abastecimento. Acompanhamento da **safra brasileira de cana-de-açúcar**: safra 2012/2013. Brasília < http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2 > acesso em 18 de março de 2013.

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

CTC. **Manual de métodos de análises para açúcar.** Piracicaba: Centro de Tecnologia Canavieira, Laboratório de análises, 2005.

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

FELIPE, M. G. A., VIEIRA, D.C., VITOLO, M., SILVA, S.S., ROBERTO, I.C., Mancilha, I.M. Effect of acetic acid on xylose cultivation by *Candida guilliermondii.* **Journal of Basic Microbiology**, v. 35, n.3, p. 171–177, 1995.

FENABRABE, Federação Nacional da Distribuição de Veículos Automotores, **Informativo**,<http://www3.fenabrave.org.br:8082/plus/modulos/listas/index.php?tac=indices-e-numeros&idtipo=1&layout=indices-e-numeros> acesso em 19 de março de 2013.

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

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The journal of biological chemistry.** Bethesda, v. 73, n. 2, p. 627-50, 1927.

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

FROMANGER, R.; GUILLOUET, S.E.; URIBELARREA, J.L; MOLINA-JOUVE, C.; CAMELEYRE, X. Effect of controlled oxygen limitation on Candida shehatae physiology for ethanol production from xylose and glucose. **Journal Ind Microbiol Biotechnol,** v. 37, p. 437–445, 2010.

FU, N.; PEIRIS, P.; MARKHAM, J.; BAVOR, J. A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on 72 glucose/xylose mixtures**. Enzyme and Microbial Technology**, v.45, p. 210–217, 2009.

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

GARCIA, D.B.; RAVANELI, G.C.; MADALENO, L.L.; MUTTON, M.A.; MUTTON, M.J.R. Damages of spittlebug onsugarcane quality and fermentation process. **Scientia Agricola**, v.67, p.555‑561, 2010.

GONG, C.S.; CHEN, L.F.; FLINCKINGER, M.C.; CHIANG, L.C.; TSAO, G.T. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, n.2, p.430-436, 1981.

GOUVEIA E.S., NASCIMENTO R.T., SOUTO-MAIOR A.M., ROCHA G.J.M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Quimíca Nova** 32:1500–1503, 2009.

GUIDI, R. H. **Caracterização, classificação e determinação de marcadores genético moleculares de estirpes e leveduras contaminantes do processo fermentativo.** Dissertação de mestrado, 2000 - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2000.

GUPTA, R., SHARMA, K., KUHAD, C.; Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by Saccharomyces cerevisiae and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. **Bioresource Technol**. 100, 1214-1220, 2009.

HAHN-HAGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 933-943, 1994.

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

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

KERN, M.; HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D., Induction of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Candida tenuis* CBS4435. **FEMS Microbiology Letters,** v.149, p.31-37,1997.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, K. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. **International Sugar Journal,** v. 106, n.1263, p. 147-150, 2004.

KÖTTER P, CIRIACY M., Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiol and Biotechnol**; v.38, p.776–83,1993.

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

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

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

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

LYND, R.L.; VAN ZYL, W.H.; McBRIDE, J.E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.577-583, 2005.

MAPA. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Disponível em http://www.agricultura.gov.br Acesso em março de 2013.

MARGARITIS, A.; BAJPAI, P. Direct fermentation of D-xylose to ethanol by *Kluyveromyces maxianus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, n.5, p.1039-1041, 1982.

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

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

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

MCMILLAN, J.D. **Xylose fermentation to ethanol: a review**. NREL, Golden, CO, 53p, 1993.

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

MORAES, E. J. C. **Estudo de Viabilidade econômica da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada.** 157p, 2008, Tese de Doutorado - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

MOUTTA, R. O**.; Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrosilado hemicelulósico visando à utilização de processos em produção de bioetanol.** 2009, Dissertação de Mestrado - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2009.

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

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

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

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

PATURAU, J.M. **By-Products of Sugar Cane Industry**, 3rd Edition, Elsevier, Amsterdam, 1989.

PEREIRA, F. C., **Study of the bioconversion of pentoses and hexoses into bioethanol by Spathaspora arborariae. 119f, 2010,** Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Porto Alegre, 2010.

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

POURQUIE, J.; VANDECASTEELE, J. P. **Conversão dos compostos lignocelulósicos por hidrólise enzimática e fermentação acetona-butanol**. São Paulo: Manole, cap. 2, p. 427-440, 1985.

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

RAVANELI, G.C.; MADALENO, L.L.; PRESOTTI, L.E.; MUTTON, M.A.; MUTTON, M.J.R. Spittlebug infestation in sugarcane affects ethanolic fermentation. **Scientia Agricola**, v.63, p.543‑546, 2006.

RAVANELI, G. C.**Qualidade da matéria-prima, microbiota fermentativa e produção de etanol sob ataque de Mahanarva fimbriolata em cana-de-açúcar** 90f, 2010, Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2010.

RODRIGUES, F. A. Avaliação da Tecnologia de Hidrólise Ácida de Bagaço de Cana. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2007.

ROSSELL, C.E.V. **Conversion of lignocellulose biomass (bagasse and straw) from the sugar-alcohol industry into bioethanol**. Industrial Perspectives for Bioethanol. Ed. Telma Franco. Cap. 8, p.123-142. ISBN 85-98951-06-4, 2006.

ROSSELL, C. E. V.; em Palestra apresentada no II Workshop Tecnológico sobre Hidrólise para Produção de Etanol, entilulada **“Fermentação do Hidrolisado”**, Unicamp, 2007.

SALLES, B. B.; **Construção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes superexpressoras de transportadores de pentoses**. 30p, 2010, Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfrual on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p.315–318, 1988.

SANTOS, J. B., **Processo de solubilização, hidrólise e degradação de celulose e derivados em presença de catalisadores metálicos a base de sn(iv)**, 72f, 2010, Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Alagoas, 2010.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, 2012.

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

SILVA, D.D.V.; FELIPE, M.G.A. Effect of glucose:xylose ratio on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities from *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, p.1294-1300, 2006.

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

SHI, N. Q.; PRAHL, K.; HENDRICK, J.; CRUZ, J.; LU, P., Characterization and complementation of a *Pichia stipitis* mutant unable to grow on d-xylose or l-arabinose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 201-215, 2000.

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

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

TOIVARI, M.H., ARISTIDOU, A., RUOHONEN, L., PENTTILLA, M. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of xylulokinase (XKS1) and oxygen viability. **Metabololism Engineering**, v. 3,p. 236–249, 2001.

TOIVOLA, A.; YARROW, D.; VAN DEN BOSCH, E.; VAN DIJKEN, J.P. E SCHEFFERS, W.A. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. *Applied* **and Environmental Microbiology**, 47, p.1221-1223, 1984.

UDOP. **União dos Produtores de Bioenergia.** Disponível em: http://www.udop.com.br . Acesso em: 13.out. 2012.

UNICA. **Setor sucroenergético**. 2008. Disponível em: <http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode=11891360-41CC- 459C-9A22-191506941834>. Acesso em: 20 dez. 2012.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. R. **Analysis of forages and fibrous foods: a laboratory manual for animal science**. Illaca: Coronell University, 202p, 1985.

ZOCCA, T. N.; OLIVEIRA M.; SILVA, W. S.; AGUIAR C. L. **Termoestabilidade de compostos bioativos de ponteiros de cana-de-açúcar com impacto na**

atividade antioxidante “in vitro”, painel apresentado no Siicusp Campus de Pirassununga - SP, 2012.

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