

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

**EMPREGO DA *Moringa oleífera* LAM PARA  
DESTOXIFICAÇÃO DO LICOR HEMICELULÓSTICO DE  
SORGO E CANA-ENERGIA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL  
DE SEGUNDA GERAÇÃO**

**Cristhyane Millena de Freitas**

Tecnóloga em Biocombustíveis

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

**EMPREGO DA *Moringa oleífera* LAM PARA  
DESTOXIFICAÇÃO DO LICOR HEMICELULÓSTICO DE  
SORGO E CANA-ENERGIA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL  
DE SEGUNDA GERAÇÃO**

**Cristhyane Millena de Freitas**

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

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

**2020**

F866e      Freitas, Cristhyane Millena  
Emprego da *Moringa oleífera* LAM para destoxificação do licor hemicelulósico de sorgo e cana-energia para produção de etanol de segunda geração /  
Cristhyane Millena de Freitas — Jaboticabal, 2020  
120 p. : il., tabs, fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
Orientadora: Márcia Justino Rossini Mutton

1. Hidrolisado. 2. Licor hemicelulósico. 3. Hidrólise ácida. 4. *Moringa oleífera* LAM. 5. *Pichia kudriavzevii*. I. Produção de etanol de segunda geração com tratamento do licor e misturas de sorgo biomassa e cana-energia.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pela autora.

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EMPREGO DA *Moringa oleifera* LAM PARA DESTOXIFICAÇÃO DO LICOR HEMICELULÓSICO DE SORGO E CANA-ENERGIA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

AUTORA: CRISTHYANE MILLENA DE FREITAS

ORIENTADORA: MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON

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

Profa. Dra. MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON (Participação Virtual)  
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. MARIA DAS GRAÇAS DE ALMEIDA FELIPE (Participação Virtual)  
Departamento de Biotecnologia-EEL/USP / Lorena/SP

Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI (Participação Virtual)  
Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural-UFSCar / Araras/SP

Profa. Dra. JULIANA PELEGRINI ROVERO (Participação Virtual)  
ETEC / Guariba/SP

Prof. Dr. JOSÉ ANTONIO BRESSIANI (Participação Virtual)  
CanaVialis - Melhoramento / Campinas/SP

Jaboticabal, 17 de novembro de 2020

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**Cristhyane Millena de Freitas** – Nasceu aos 22 de agosto de 1982, no município de Taquaritinga, estado de São Paulo. Em fevereiro de 2012 ingressou no curso de Tecnologia em Biocombustíveis na Faculdade de Tecnologia, Fatec Nilo De Stéfani, Jaboticabal, recebendo o título de Tecnóloga em Biocombustíveis em dezembro de 2014. Em fevereiro de 2015 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP, recebendo o título de Mestre em Microbiologia Agropecuária em fevereiro de 2017. Em março de 2017 ingressou na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP, no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária em nível de Doutorado Acadêmico que será concluído em novembro de 2020.

## **Epígrafe**

*...”. Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, a desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é decidir...”*

*- Cora Coralina*

**Ao meu companheiro Maicon, por  
toda compreensão e apoio em minhas  
ausências.**

**A meus pais, pelos conselhos,  
compreensão e amor incondicional.**

**A minha irmã pela por todo amor,  
carinho e parceria em nossos dias.**

**Dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

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

Agradeço imensamente a Profa. Dra. Márcia R.J. Mutton e Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton, pela oportunidade, pela confiança, principalmente por me darem condições de uma nova caminhada, incentivando e me mostrando que seria capaz de trilhar este caminho, sempre com ensinamentos esclarecedores, vocês realmente fazem valer a profissão honrosa de professores, e se hoje tenho este título é pelo incentivo e aprendizagem com vocês.

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

Ao Programa de Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP) pela oportunidade de realizar o curso de Pós-graduação em microbiologia agropecuária em nível de doutorado.

A Escola de Engenharia de Lorena - EEL/USP, pela parceria e desenvolvimento do processo.

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

Ao Prof. Dr. Michel Brienza e sua equipe pela colaboração da realização de algumas análises deste projeto.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A minha querida irmã e companheira Lidyane, pela paciência, amor, carinho e ensinamentos, sem você em minha vida jamais chegaria até aqui.

Aos meus pais pelo apoio, incentivo e amor incondicional, se hoje estou alcançando esta realização, é porque vocês me deram condições e sempre estiveram ao meu lado.

Ao meu querido companheiro Maicon, pela infinita paciência, amor e acima de tudo compreensão pela ausência ao longo dos dias, você realmente faz sentido ao significado da palavra companheiro.

Aos meus amigos de laboratório que levarei para toda vida: Lidyane, Gustavo, Natália, Franciele, Letícia, Aline, Vitor, Juliana com vocês aprendi demais e também vivi momentos inesquecíveis, alguns cansativos, mas sempre com muita alegria.

Aos amigos de Laboratório que convivi pouco tempo, mas que também foram importantes: Osania, Nayara Montijo, Rita, Marcel, Matheus Irene, Silvia, Marcelo, Jorge, Guilherme, João Francisco e João.

Ao técnico de Laboratório Sérgio Nobokuni.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	i
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	x
1.0 INTRODUÇÃO.....	1
2.0 OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVO GERAL .....	3
3.0 REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3.1 Cenário do Setor Sucroenergético e dos Biocombustíveis.....	4
3.2 Classificação dos Biocombustíveis .....	5
3.3 Novas matérias-primas.....	8
3.3.1 Cana-energia.....	9
3.3.2 Sorgo biomassa.....	11
3.3.3 Novas matérias-primas e a colaboração da entressafra da cana.....	13
3.4 Composição química de biomassa lignocelulósica.....	15
3.4.1 Celulose.....	17
3.4.2 Hemicelulose .....	19
3.4.3 Lignina .....	21
3.4.4 Extrativos e Cinzas .....	23
3.5 Etanol de Segunda Geração.....	25

3.6 Etapas do processo de etanol de segunda geração.....	26
3.7 Pré-tratamentos aplicados nas biomassas lignocelulósicas.....	27
3.8 Pré-tratamento Ácido Diluído.....	35
3.9 Destoxificação do licor lignocelulósico.....	36
3.10 Método de Destoxificação Sustentável.....	41
3.11 Biofloculante de <i>M. oleífera</i> Lam.....	42
3.12 Processo Fermentativo Lignocelulósico.....	44
3.13 Levedura <i>P. kudriavzevii</i> .....	46
3.14 Os desafios do Etanol Lignocelulósico.....	48
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 Instalação e condução do experimento.....	51
4.2 Delineamento Experimental.....	52
4.3 Característica da Biomassa.....	52
4.4 Obtenção e Caracterização dos Bagaços.....	53
4.5 Obtenção dos Licores.....	55
4.6 Quantificação de Açúcares e Concentração Licor Hemicelulósico.....	57
4.7 Tratamento do Licor – Destoxificação.....	57
4.8 Levedura.....	58
4.9 Preparo do Inóculo.....	58
4.10 Processo Fermentativo.....	59
4.11 Análises Microbiológicas .....	61

4.12 Delineamento Experimental (Processo Fermentativo) .....	62
4.13 Produção de Etanol .....	63
4.14 Análise dos resultados .....	63
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1 Caracterização dos Bagaços Cana-Energia e Sorgo biomassa.....	64
5.2 Determinação dos açúcares no licor hemicelulósico .....	66
5.3 Destoxificação do Licor .....	68
5.4 Processo Fermentativo – Viabilidade Celular.....	73
5.5 Produção de Etanol.....	85
5.6 Nutrientes.....	89
6.0 CONCLUSÕES .....	93
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

## EMPREGO DA *Moringa oleífera* LAM PARA DESTOXIFICAÇÃO DO LICOR HEMICELULÓSTICO DE SORGO E CANA-ENERGIA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

**RESUMO** – Para que se tenha o aproveitamento das frações lignocelulósicas de biomassas residuais, é necessário disponibilizar os açúcares congênitos, porém o rompimento das células vegetais, geram também constituintes prejudiciais para os microrganismos nos processos fermentativos, logo uma etapa de destoxificação é necessária. Comumente emprega-se o método do carvão ativado, mas este gera resíduos no meio e alternativas devem ser propostas. Neste contexto, objetivou-se avaliar diferentes métodos de destoxificação de licores hemicelulósicos em duas matérias-primas fibrosas, sorgo biomassa e cana-energia, através da hidrólise ácida diluída. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com mistura gradativa de sorgo biomassa e cana-energia (SB: CE), nas proporções de 25:75%; 50:50%; 75:25% e de 100 (CE) %, 100%(SB) como tratamento principal. O tratamento secundário foi a destoxificação dos licores com o tratamento convencional (carvão ativado), biofloculante de *M. oleífera* LAM e a não destoxificação. Avaliou-se a caracterização da celulose, hemicelulose, lignina, os teores de compostos fenólicos totais ( $\text{mg. L}^{-1}$ ), acidez total ( $\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), viabilidade celular, brotos e brotamento no processo fermentativo, glicerol (%), teor alcoólico (%) e nutrientes. A utilização da *M. oleífera* LAM como biofloculante no processo de destoxificação dos licores para produção de etanol de segunda geração reduziu significativamente compostos inibitórios como fenóis e ácidos totais, ocasionando assim, viabilidades celulares importantes para promover o reciclo de células. A levedura *Pichia kudriavzevii* LJ3, utilizada neste experimento demonstrou desempenho fermentativo superior, em meios tratados com moringa, tanto para o sorgo biomassa, quanto para cana-energia. O tratamento da biomassa constituído unicamente de sorgo demonstrou maiores teores alcoólicos, especialmente quando se associou com o método com *M. oleífera* LAM. Contudo tem-se que a metodologia de destoxificação da *M. oleífera* LAM foi eficiente devido ao reflexo exercido no processo.

**Palavras-Chave:** Hidrolisado, Bagaço de cana, biomassas celulósicas, Pentose, *Pichia kudriavzevii*.

## EMPLOYMENT OF *Moringa oleifera* LAM FOR DESTOXIFYING HEMICELLULOSTIC LIQUOR FROM SORGHUM AND CANE-ENERGY FOR SECOND GENERATION ETHANOL PRODUCTION

**ABSTRACT** - In order to take advantage of the lignocellulosic fractions of residual biomass, it is necessary to make available the congenital sugars, but the disruption of plant cells also generates harmful constituents for microorganisms in fermentation processes, so a detoxification step is necessary. The activated carbon method is commonly used, but it generates residuals in the environment and alternatives must be proposed. In this context, the objective was to evaluate different methods of detoxification of hemicellulosic liquors in two fibrous raw materials, sorghum biomass and energy cane, through diluted acid hydrolysis. The experimental design used was completely randomized, with a gradual misturasof biomass sorghum and energy cane (SB: CE), in the proportions of 25: 75%; 50: 50%; 75: 25% and 100 (EC)%, 100% (SB) as the main treatment. The secondary treatment was the detoxification of the liqueurs with the conventional treatment (activated carbon), bioflocculant from *Moringa oleifera* LAM and the non-use of the detoxification. The characterization of cellulose, hemicellulose, lignin, the contents of total phenolic compounds (mg. L<sup>-1</sup>), total acidity (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gL<sup>-1</sup>), cell viability, shoot viability and budding in the fermentation process, glycerol ( %), alcohol content ( %) and nutrients. The use of *Moringa oleifera* LAM as a bioflocculant in the detoxification process of liquors for the production of second generation ethanol significantly reduced inhibitory compounds such as phenols and total acids, thus causing important cellular viability to promote cell recycling. The yeast *P. kudriavzevii* LJ3, used in this experiment demonstrated superior fermentative performance, in medium treated with moringa, both for biomass sorghum and for energy cane. The treatment of biomass consisting solely of sorghum showed higher alcoholic levels, in conjunction with the method with oil *Moringa* LAM. However, it has been found that the detoxification methodology with oil *Moringa* LAM was efficient due to the reflex exerted in the process.

**Keywords:** Hydrolyzate, sugarcane bagasse, cellulosic biomass, Pentose, *Pichia kudriavzevii*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Uso energético no setor de transportes por combustível e ano e emissões totais de CO <sub>2</sub> para Limitar o aumento médio da temperatura global 2°C. Fonte: Fulton et.al, 2015.....	4
<b>Figura 2</b>	Esquema contendo as diferentes etapas para a Produção de etanol 1G e 2G.....	7
<b>Figura 3</b>	Novas Biomassas com potencial lignocelulósico para produção de etanol de segunda geração - Cana-energia e Sorgo biomassa .....	9
<b>Figura 4</b>	Comparação do diâmetro em relação a produtividade da cana-energia versus a cana convencional. ....	10
<b>Figura 5</b>	Cultivo de Sorgo biomassa - Cultivar Palo Alto, localizado na área experimental da produção vegetal da FCAV/UNESP – Jaboticabal, safra 2018/2019.....	11
<b>Figura 6</b>	Cenário atual da produção de cana-de-açúcar no formato de planejamento industrial, referente aos meses de plantio e colheita da matéria-prima. ....	14
<b>Figura 7</b>	Proposta de cenário da produção de cana-de-açúcar no formato de planejamento industrial, referente aos meses de plantio e colheita com a introdução de Sorgo biomassa e Cana-energia. ....	14
<b>Figura 8</b>	Processo de Extração do Caldo de cana-de-açúcar através de moendas.....	16
<b>Figura 9</b>	Composição do bagaço de cana-de-açúcar com os constituintes da Estrutura Lignocelulósica: celulose, hemicelulose e lignina. ....	17
<b>Figura 10</b>	Estrutura da Composição da Celulose. ....	18
<b>Figura 11</b>	Representação estrutural das paredes celulares dos vegetais por interações entre os polissacarídeos de celulose. ....	19
<b>Figura 12</b>	Arranjo estrutural da conformidade da Composição da Hemicelulose. ....	20
<b>Figura 13</b>	Arranjo estrutural da conformidade da Composição da Lignina .....	21
<b>Figura 14</b>	Arranjo estrutural da conformidade entre Lignina , celulose e hemicelulose .....	22

<b>Figura 15</b> Composição do Material Lignocelulósico: Extrativos, cinzas e substâncias macromoleculares .....	24
<b>Figura 16</b> Fluxograma comparativo da Produção de etanol 1G e 2G, demonstrando as etapas diferenciadas dos processos.....	25
<b>Figura 17</b> Fluxograma demonstrativo das principais etapas para obtenção do etanol 2G.....	27
<b>Figura 18</b> Ilustração do desarranjo provocado pelo processo de pré-tratamento em materiais lignocelulósicos.....	28
<b>Figura 19</b> Esquema ilustrativo das diferentes formas de condução do processo de pré-tratamento na produção de etanol lignocelulósico .....	29
<b>Figura 20</b> Pré-tratamento de Biomassa lignocelulósica e os possíveis carboidratos e inibidores formados da degradação por ácido diluído...38	
<b>Figura 21</b> Método de Destoxificação por diferença de pH e carvão ativado (Marton, 2006).....	39
<b>Figura 22</b> Processo de Destoxificação convencional do licor hemicelulósico e Processo sustentável com <i>M. oleífera</i> Lam.....	42
<b>Figura 23</b> Característica da Árvore de <i>M. oleífera</i> Lam.....	43
<b>Figura 24</b> Colheita, Extração e Desfibramento do bagaço de Cana-Energia e Sorgo biomassa.....	53
<b>Figura 25</b> Secagem dos bagaços de cana-energia e sorgo biomassa.....	54
<b>Figura 26</b> Condição experimental da cana-energia e do sorgo biomassa isolados e misturados para a entrada no biorreator de pré-tratamento. para disponibilização dos açúcares contidos nos bagaços. ....	55
<b>Figura 27</b> Ativação e Crescimento da levedura <i>P. kudriavzevii</i> .....	59
<b>Figura 28</b> Processo Fermentativo com a quantificação da viabilidade celular.....	60
<b>Figura 29</b> Resultado da Interação de Compostos Fenólicos para os Misturados Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%). ....	70
<b>Figura 30</b> Resultado da Interação de Acidez Total para os Misturados Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%). ....	72

- Figura 31** Resultado da Interação de Viabilidade Celular para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%)). .....75
- Figura 32** Resultado da Interação de Viabilidade Celular para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%)). .....77
- Figura 33** Resultado da Interação de Viabilidade Celular para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%)). .....78
- Figura 34** Resultado da Interação do Brotamento para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%)). .....79
- Figura 35** Resultado da Interação do Brotamento para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%)). .....80
- Figura 36** Resultado da Interação do Brotamento para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%)). .....82
- Figura 37** Resultado da Interação da Viabilidade dos Brotos para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%)). .....82
- Figura 38** Resultado da Interação da Viabilidade dos Brotos para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%)). .....83
- Figura 39** Resultado da Interação da Viabilidade dos Brotos para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%)). .....84
- Figura 40** Valores médios observados e resultados da análise de variância e teste de Tukey para o Glicerol do processo fermentativo dos Tratamento dos licores (sem destoxificação, destoxificado e tratado com *M. oleífera* LAM). .....87

**Figura 41** - Valores médios observados e resultados da análise de variância e teste de Tukey para o teor alcoólico na Interação das Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%) com o tratamento dos licores (Sem destoxificação, Destoxificado e Tratado com *M. oleífera* LAM). .....88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação dos biocombustíveis, fonte primária de produção, vantagem e desafio mais relevantes. ....	6
<b>Tabela 02</b>	Dados médios da composição química dos bagaços in natura de Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), Cana-energia (50%) + Sorgo biomassa (50%), Cana-energia (25%) + Sorgo biomassa (75%) e Cana-energia (75%) + Sorgo biomassa (25%). ....	64
<b>Tabela 3</b>	Resultados da composição média dos licores obtido após o pré-tratamento com ácido diluído em duas condições, com relação a glicose e xilose. ....	67
<b>Tabela 4</b>	Valores médios obtidos para Acidez total e Fenol dos licores nos genótipos cana-energia e sorgo biomassa e as misturas.....	68
<b>Tabela 5</b>	Dados estatísticos das análises de Viabilidade do Processo, Brotamento das Células e Viabilidade dos Brotos. ....	73
<b>Tabela 6</b>	Dados estatísticos para os componentes de glicerol e teor alcoólico, para os tratamentos em que se utilizou as matérias-primas isoladas e misturadas e diferentes métodos de destoxificação. ....	86
<b>Tabela 7</b>	Quantificação dos teores de nutrientes nas matérias-primas sorgo biomassa e cana-energia, nas condições de bagaço in natura e no licor hemicelulósico. ....	90

## 1. INTRODUÇÃO

A demanda ambiental de sustentabilidade, é cada vez mais intensificada pela mitigação, de alvos poluidores, para que haja uma condição melhor para as próximas gerações. Os gases de efeito estufa, em destaque o excesso de dióxido de carbono, são grandes colaboradores para este descontrole ambiental.

O controle desta situação é uma das principais medidas implantadas por diversos países, no Brasil, o compromisso de redução foi de 47% nos próximos cinco anos (RENOVABIO, 2019). Um dos setores de grande colaboração para tal feito, é o sucroalcooleiro, pela relação de substituição gradual de combustíveis fósseis pelos biocombustíveis.

No entanto, as usinas, produzem quantidades limitadas de biocombustíveis, devido a disponibilidade de matéria-prima cultivada e estabelecida. Para que ocorra o aumento de produção em litros de etanol, é necessário o aumento de áreas cultivadas ou ainda a adoção de novas matérias-primas em complementação a cana-de-açúcar.

Neste caso, a utilização de tecnologias que favoreçam o aumento de produtividade, aproveitando o mesmo ciclo produtivo, ou ainda o emprego de resíduos gerados como o bagaço de cana, possibilitam ao Brasil alcançar a meta proposta.

O bioetanol obtido por este processo de aproveitamento do bagaço é conhecido por etanol de segunda geração (2G), e ocorre através do rompimento das células da biomassa, disponibilizando os açúcares em um líquido denominado licor hemicelulósico, ao qual será fermentado e convertido no biocombustível, etanol. Porém, para que tal condição incida, alguns compostos como fenóis e ácidos também são liberados, resultando em material com impurezas, impróprias para o processo fermentativo.

Para tanto a remoção desta impureza possibilita a transformação do etanol pelos microrganismos, sendo denominada como detoxificação, ou destoxificação do licor.

Na literatura há algumas propostas para o tratamento deste licor, cada uma possuindo um grau de eficiência, entretanto nenhum método foi totalmente consolidado. O procedimento de destoxificação mais utilizado é o método de carvão ativado, ou método convencional que gera grande quantidade de produtos químicos, como óxido de cálcio, ácido fosfórico e carvão ativado, encarecendo o processo de destoxificação pela grande quantidade utilizada.

Outras possíveis formas de promover essa purificação, pode ser dar através da utilização de auxiliares de sedimentação das impurezas, podendo estes ser polímeros químicos e/ou biofloculante naturais, como o de *M. oleífera* LAM.

O extrato de semente de Moringa possui propriedades coagulantes, que remove as impurezas através de proteínas que realizam o arraste, sedimentando parte dos compostos indesejados. Além, do que se tem um produto proveniente de biomassa vegetal, com consequências menores ao ambiente em relação aos compostos químicos.

Contudo incidir esta nova metodologia no processo de destoxificação hemicelulósico, analisando sua adaptação e produtividade pela levedura fermentadora em biomassas fibrosas, é imprescindível.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi propor uma nova tecnologia de destoxificação, com o emprego do extrato de *M. oleífera* LAM, comparado ao método convencional de carvão ativado, em genótipos isolados e combinados de sorgo biomassa e cana-energia, fermentados pela estirpe de levedura *P. kudriavzevii* LJ3 para produção de etanol de segunda geração.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

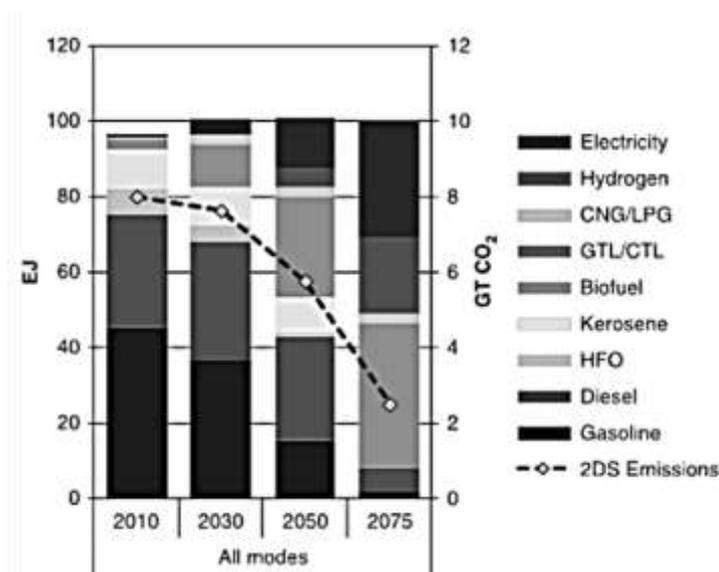
1. Caracterização do Bagaço individual e em mistura sorgo biomassa e cana-energia, in natura e após processo de pré-tratamento;
2. Pré-tratamento dos bagaços pelo método de hidrólise ácido-diluído nas biomassas sorgo e cana-energia, isoladas e misturadas;
3. Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico empregando o uso do tratamento convencional em comparação a utilização do biofloculante de *M. oleífera* LAM e carvão ativado vegetal;
4. Determinações de macro e micronutrientes do sorgo biomassa e da cana-energia nas biomassas in-naturas e no licor hemicelulósico;
5. Avaliações das Fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos das diferentes biomassas cana-energia e sorgo, no desempenho fermentativo da levedura *P. kudriavzevii* LJ3 para a produção de etanol de segunda geração;
6. Avaliação do teor alcoólico e produção de glicerol no processo fermentativo, submetido ao método de destoxificação com emprego de moringa.

### 3.0 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Cenário do Setor Sucreenergético e dos Biocombustíveis

O panorama geral do setor sucreenergético demonstra que o momento é de um período de ajustes, no qual busca-se o equacionamento da sua situação financeira. Neste contexto, estão inseridas ações para melhoria dos fatores de produção, as quais propiciam redução dos custos e aumento de margem, elevando sua sustentabilidade financeira (EPE, 2020).

Sob a ótica das políticas públicas, o governo federal tem procurado sinalizar e prover os incentivos econômicos adequados para a retomada dos investimentos. Como exemplo, citam-se a manutenção das linhas de financiamento e a diferenciação tributária entre o etanol e a gasolina, com preço crescente deste combustível previsto até 2026, promovendo o aumento gradual dos biocombustíveis (Figura 01) (RENOVABIO, 2019; EPE, 2020).



**Figura 1** Uso energético no setor de transportes por combustível e ano e emissões totais de CO<sub>2</sub> para Limitar o aumento médio da temperatura global 2°C. Fonte: Fulton et.al, 2015.

A projeção da oferta de etanol considera uma série de premissas, tais como, a expansão da capacidade produtiva com novas biomassas complementares a cana-de-açúcar, colaborando assim para a evolução dos fatores de produção (como produtividade agrícola ( $tc.ha^{-1}$ ), além do estágio tecnológico do etanol de segunda geração (lignocelulósico/E2G) e a produção de etanol de milho (EPE, 2017).

O Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE) identificou o etanol celulósico de cana-de-açúcar (ou etanol de segunda geração - E2G) como o biocombustível avançado em estágio de desenvolvimento mais próximo da comercialização, como atestam as duas unidades industriais instaladas no Brasil, três nos Estados Unidos da América (EUA) e mais uma ou duas em outros continentes (CGEE, 2018).

Os biocombustíveis e a bioenergia são absolutamente estratégicas para o progresso da bioeconomia moderna, pois proporcionam escalas de produção e consumo capazes de acelerar a curva de aprendizagem que conduz à disponibilização de matéria prima abundante e a preços competitivos, para viabilizar múltiplos processos industriais gerados em biorrefinarias, na perspectiva do surgimento da era pós-petróleo (pós-combustíveis fósseis em geral) (RENOVABIO, 2019).

### **3.2 Classificação dos Biocombustíveis**

Os biocombustíveis são classificados em convencionais e avançados, esta denominação se dá de acordo com a disponibilização dos açúcares a serem fermentados. Os convencionais também conhecidos como de primeira geração (1G), são aqueles que a fermentação ocorrerá diretamente no caldo extraído da matéria-prima, como exemplo a cana-de-açúcar, para qual suas tecnologias já estão estabelecidas. Os avançados, são aqueles que necessitam de etapas adicionais para

fermentação, ou seja, seus açúcares encontram-se dentro das células das biomassas, como exemplo o bagaço de cana, denominando-se como de segunda geração (2G) ou terceira geração (3G), e neste caso ainda se tem algumas etapas a serem determinadas. (Tabela 01).

As características do produto são iguais, independente de qual geração ele será produzido, o que muda são as fontes e métodos de produção dos quais o combustível é derivado. A Agência Internacional de Energia (International Energy Agency - IEA) considera os biocombustíveis avançados como combustíveis sustentáveis produzidos a partir de matérias-primas não alimentares, que não competem diretamente com o uso de terras agrícolas para produção de alimentos e rações e que apresentam índice reduzido de até 90% de emissões de gases do efeito estufa em comparação com combustíveis fósseis (CGEE, 2018).

**Tabela 1** - Classificação dos biocombustíveis, fonte primária de produção, vantagem e desafio mais relevantes.

Classificação	Fonte primária de produção / Matéria-prima	Vantagem	Desafio
Primeira geração (1G)	Culturas alimentares (milho, soja, cana-de-açúcar, etc)	Indústria estabelecida	Compatibilização com a produção de alimentos
Segunda geração (2G)	Culturas não-alimentares, resíduos agrícolas, resíduos florestais, óleo vegetal usado, etc	Redução de GEE	Otimização de rotas tecnológicas
Terceira geração (3G)	Algas	Alta produtividade	Redução dos custos de produção

**Fonte:** Relatório CGEE, 2018.

Os biocombustíveis de primeira geração (1G) são considerados biocombustíveis convencionais, pois são produzidos diretamente de culturas produtivas/alimentares, e tem os açúcares disponíveis para fermentação direta. A

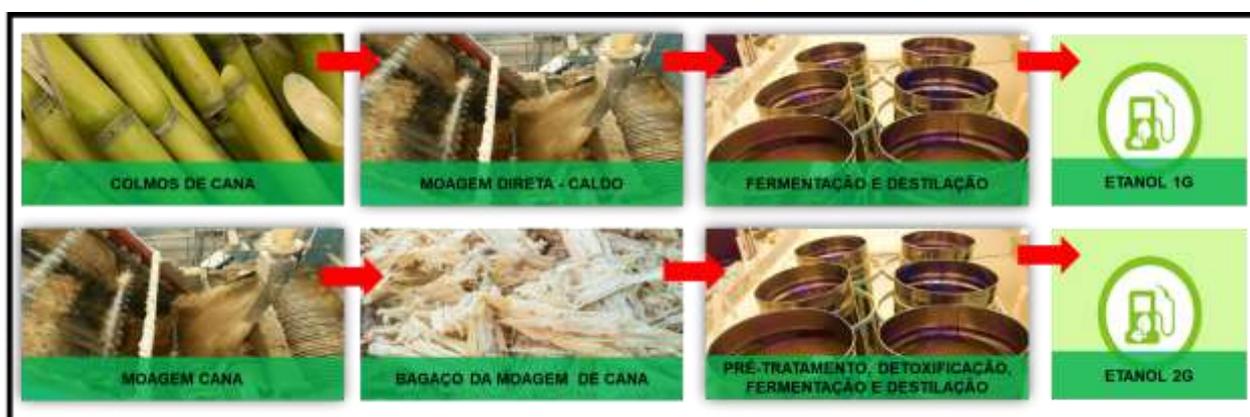
cana-de-açúcar é a matéria-prima mais utilizada seguida do milho, para a produção de bioetanol (ANP, 2018).

O etanol produzido diretamente a partir da fermentação do caldo da cana de açúcar é um biocombustível de primeira geração, apesar de ser classificado como biocombustível avançado pelo critério de redução de emissões.

Os biocombustíveis de segunda geração (2G) podem ser obtidos a partir de uma variedade de fontes de resíduos de matérias-primas. Estas incluem resíduos agrícolas associados a culturas alimentares, bem como resíduos florestais, como serragem da produção de madeira. Outras fontes incluem cultivos energéticos não alimentícios, como gramíneas de rápido crescimento – cana-energia e sorgo biomassa - e espécies de árvores de rotação curta - choupo e eucalipto (ANP, 2018; CGEE, 2018).

As culturas de primeira geração podem contribuir para a produção de biocombustíveis de segunda geração, se elas já cumpriram o seu propósito produtivo (Figura 02). Como exemplo temos o bagaço de cana, que poderá ser queimado diretamente para obter calor, gerando energia, ou ainda produzir etanol 2G.

**Figura 2** – Esquema contendo as diferentes etapas para a Produção de etanol 1G e 2G.



Fonte: Elaboração Própria

### 3.3 Novas matérias-primas

A energia da biomassa, ou bioenergia, pode ser produzida a partir de uma ampla gama de matérias-primas de origem biológica usando diferentes vias de conversão. Enquanto umas já estão bem estabelecidas e totalmente consolidadas, outras ainda estão em desenvolvimento, demonstração e estágios iniciais de comercialização.

A bioenergia é usada para produzir calor, electricidade e combustíveis para transporte (biocombustíveis). A viabilidade financeira e a pegada de carbono de bioprodutos primários (alimentos e rações, materiais, produtos químicos e energia) pode ser melhorada com o uso de bioenergia, ajudando a manter as indústrias existentes mais limpas e sustentáveis, criando um ambiente mais atrativo para novos projetos promovendo economias de escala que por sua vez ajudam a reduzir os custos de novas tecnologias.

Uma ampla gama de matérias-primas de biomassa pode ser usada como fonte de bioenergia. Estas incluem: culturas agroalimentares como milho, trigo, cana-de-açúcar, beterraba açucareira e óleos vegetais produzidos a partir de palma, soja, colza e outras matérias-primas; culturas não alimentares de alta produtividade e com finalidades energéticas como sorgo biomassa e cana-energia (Figura 03) (IEA, 2017).

**Figura 3** - Novas Biomassas com potencial lignocelulósico para produção de etanol de segunda geração - Cana-energia e Sorgo biomassa



Fonte: Elaboração Própria.

Há também, árvores de curtos períodos (como salgueiros e eucaliptos) oleaginosas (como pinhão manso e camelina), resíduos e coprodutos das agroindústrias e da indústria madeireira; resíduos orgânicos úmidos (como lodo de esgoto), resíduos animais (como sebo bovino), efluentes líquidos orgânicos e a fração orgânica de resíduos sólidos urbanos (RSU) (IEA, 2017).

### 3.3.1 Cana-energia

O conceito de cana-energia está fundamentado na sua composição estrutural sendo diferenciada da cana convencional. É uma biomassa geneticamente modificada a partir do cruzamento de espécies ancestrais e híbridos comerciais de cana-de-açúcar, com o objetivo de ser mais produtiva na fabricação de biocombustível, bioquímicos e geração de energia renovável (GRANBIO, 2017).

Uma de suas maiores vantagens é apresentar habilidade de ser cultivada em áreas com baixa aptidão agrícola o que permite a exploração de regiões desfavorecidas, o aumento da produtividade, além de não competir com a produção

de alimentos. A cana-energia tem um sistema radicular mais profundo para maior absorção de água e nutrientes. O potencial é enorme: o Brasil tem 32 milhões de hectares de pastagens degradadas que podem ser ocupadas com cana-energia, mais do que toda a área agricultável da Europa (GRANBIO, 2017).

A planta (Figura 04), tem um diâmetro menor em relação a cana comum, porém possui uma altura superior, podendo trazer uma produtividade até três vezes maior, do que a cultura já utilizada.

**Figura 4** – Comparação do diâmetro em relação a produtividade da cana-energia versus a cana convencional.



A Granbio (2018) cita que esta variedade de cana-energia, pode ter maior longevidade do canavial, podendo atingir entre 8 e 10 cortes, sendo um fator que pode reduzir significativamente o custo de produção de matéria prima.

O teor de fibras da cana-energia é superior a 25%, e pode ser utilizada para ampliar a safra nos meses de ponta aumentando a receita agroindustrial.

Além do que, sua rusticidade e o sistema radicular mais robusto, torna-a mais resistente ao pisoteio e ao arranquio de soqueiras provocados pela mecanização da colheita, em comparação às canas convencionais (GRANBIO, 2018).

No entanto, cabe ressaltar que esta biomassa ainda passa por período de viabilização comercial, principalmente nas tecnologias de hidrólise que permitam a conversão de materiais lignocelulósicos em etanol, espera-se uma revolução no setor, uma vez que qualquer esta matéria-prima poderá colaborar com a produtividade do etanol de primeira geração.

### 3.3.2 Sorgo biomassa

O sorgo biomassa apresenta grande quantidade de massa verde, colmos grossos e fibrosos (Figura 05), pequena produção de grãos e porte muito alto (EMBRAPA, 2014).

**Figura 5** – Cultivo de Sorgo biomassa - Cultivar Palo Alto, localizado na área experimental da produção vegetal da FCAV/UNESP – Jaboticabal, safra 2018/2019.



Fonte: Acervo Pessoal.

Possui a particularidade de ser menos sensível ao fotoperíodo, o que possibilita a ampliação do ciclo vegetativo, ao mesmo tempo, que proporciona o aumento da produção de biomassa por hectare/ciclo, em comparação com as cultivares mais sensíveis (PARRELA et al., 2010; PEREIRA et al., 2012).

Esta biomassa é uma matéria-prima energética ideal devido a sua versatilidade como fonte de amido, açúcar e fibras. Pode ser empregado combustão direta em caldeiras para produção de bioenergia, assim como para a produção de biocombustíveis através de novas tecnologias (energia verde), além da produção de químicos renováveis (CARRILLO et al., 2014).

É uma planta que em 180 dias pode atingir até seis metros de altura, e que além de apresentar um rápido crescimento, a nova cultivar também tem alto potencial produtivo, podendo alcançar 150 toneladas por hectares de massa verde e cerca de 35 toneladas por hectares de massa seca por semestre (EMBRAPA, 2019).

Esta cultivar permite uma operação de implantação completamente mecanizável, uma vez que a sua propagação é realizada por sementes. Além disso, o desenvolvimento vigoroso e rápido das plantas em ambientes tropicais, principalmente em regiões com elevadas temperaturas diurnas e noturnas, proporciona maior facilidade no manejo inicial da cultura (MANTOVANI; MAY, 2013).

A sua composição estrutural possui teores médios de celulose e lignina entre 31,1-29,3% e 14,3-7,6%, respectivamente, que podem variar de acordo com o genótipo e a época de colheita (HOFFMAN; ROONEY, 2012; ROONEY et al., 2007). A alta produtividade aliada ao elevado teor de celulose torna o sorgo biomassa uma cultura indicada para a produção de etanol de segunda geração (DAHLBERG et al., 2011).

A Embrapa (2019), cita que já em condições de cadeia produtiva, o sorgo se encaixa perfeitamente para fornecer matéria prima de qualidade entre os meses de março a abril, quando há falta de bagaço de cana-de-açúcar, isso porque é neste período que as usinas ficam paradas ou estão em início de safra.

### **3.3.3 Novas matérias-primas e a colaboração da entressafra da cana-de-açúcar**

Atualmente, o Brasil enfrenta grande demanda energética por causa do deslocamento de indústrias de grande porte para Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, e estados do Nordeste, e ainda mantém a demanda do Estado de São Paulo como mais importante polo industrial do País (EMBRAPA, 2018).

Dessa forma, a busca por biomassa para a queima direta em caldeiras tem sido crescente, assim como a utilização destas matérias-primas para ampliar a produtividade de etanol acoplando os de primeira aos de segunda geração (MANTOVANI ; MAY, 2013).

Uma das alternativas mais promissoras principalmente para as regiões centro-oeste do país, que tem em sua grande maioria solos de baixa produtividade, seria a utilização de matérias-primas energéticas como o sorgo biomassa e a cana-energia, assim como o milho já vem ganhando espaço, para o qual estes complementariam a produtividade na entressafra da cana-de-açúcar, gerando bagaço e propagando o período de produtividade do setor sucroenergético.

A entressafra brasileira hoje tem o cenário de planejamento industrial estabelecido com a cana-de-açúcar convencional, na parada dos meses de novembro

a fevereiro, caracterizando um período médio de cinco meses sem funcionamento (Figura 06).

**Figura 06** – Cenário atual da produção de cana-de-açúcar no formato de planejamento industrial, referente aos meses de plantio e colheita da matéria-prima.

PLANEJAMENTO INDUSTRIAL												
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Atual												
Plantio	🌱	🌱	🌱									
Colheita	🔴	🔴	🔴	🔴	🌱	🌱	🌱	🌱	🌱	🌱	🌱	🔴

Fonte: Elaboração Própria.

A junção de novas matérias-primas promoveria um planejamento industrial com ganhos de produtividade nestes meses ociosos, ao qual se teria uma projeção de apenas um mês de entressafra. Esta situação é possível se forem utilizados o sorgo biomassa e a cana-energia (Figura 07).

**Figura 07** – Proposta de cenário da produção de cana-de-açúcar no formato de planejamento industrial, referente aos meses de plantio e colheita com a introdução de Sorgo biomassa e Cana-energia.

PLANEJAMENTO INDUSTRIAL												
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Cana Energia + Sorgo Biomassa												
Plantio	🌱	🌱	🌱							🌱	🌱	🌱
Colheita	🔴	🌱	🌱	🌱	🌱	🌱	🌱	🌱	🌱	🌱	🌱	🌱

Fonte: Elaboração Própria.

Essas biomassas consistem nas que possuem maior potencial de crescimento nos próximos anos. Dado o fato de que a biomassa pode ser utilizada para a produção de biocombustíveis e energia elétrica, tem-se tratado dela como um componente estratégico de grande importância.

As colaborações dessas biomassas são de grande importância para o setor principalmente por serem dedicadas à produção de biocombustíveis e energia. Desta forma, os produtores e as empresas do ramo agrícola/industrial poderão contar com uma matéria-prima com alta produtividade e com características que permitem um bom desempenho nos processos de cogeração e produção de etanol, ampliando assim o período de planejamento industrial (Embrapa, 2019).

#### **3.4 Composição química de biomassa lignocelulósica**

No processo de moagem dos colmos da cana-de-açúcar para produção de etanol de primeira geração tem-se como resíduo o bagaço, que é considerado como material lignocelulósico fibroso (Figura 08). Sua constituição é caracterizada em 46-52% de umidade, 43-52% de estruturas fibrilares e 2-6% de extrativos (sólidos solúveis) e componentes inorgânicos (sólidos insolúveis) (PATURAU, 1989).

**Figura 08** - Processo de Extração do Caldo de cana-de-açúcar através de moendas.



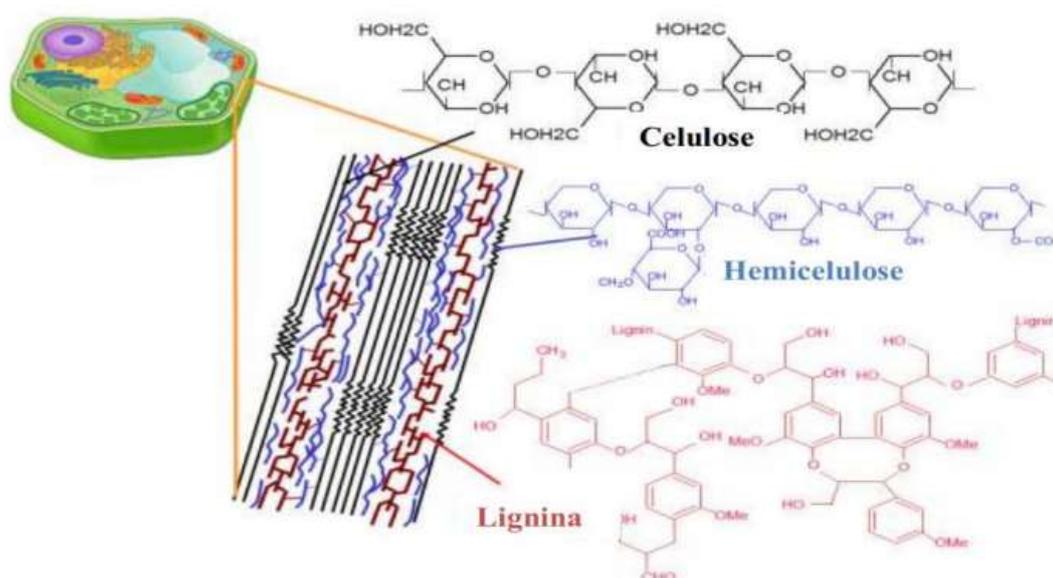
Fonte: Elaboração Própria.

Esta composição pode variar de acordo com o local de cultivo, a época de colheita, a composição do solo, a variedade assim como o período de maturação da planta; entretanto, os diferentes estudos de caracterização e aplicação deste material permitem inferir uma faixa de representação de cada componente (MOORE ; BOTHA, 2014).

Na estrutura da parede celular dos materiais lignocelulósicos, os componentes macromoleculares encontram-se em íntima associação química e estrutural, o que dificulta seu fracionamento e quantificação. As hemiceluloses se unem às fibras de celulose e as interligam com a lignina, que pode ser considerada como um “cimento” celular, criando uma rede complexa de ligações que provê força estrutural.

Conseqüentemente, nas diferentes etapas de análise, fragmentos de lignina permanecem unidos aos carboidratos, e mesmo celulose e hemiceluloses são dificilmente isoladas sem sofrer degradação e/ou mudanças nas propriedades moleculares (FENGEL; WEGENER, 1989).

**Figura 09** – Composição do bagaço de cana-de-açúcar com os constituintes da Estrutura Lignocelulósica: celulose, hemicelulose e lignina.



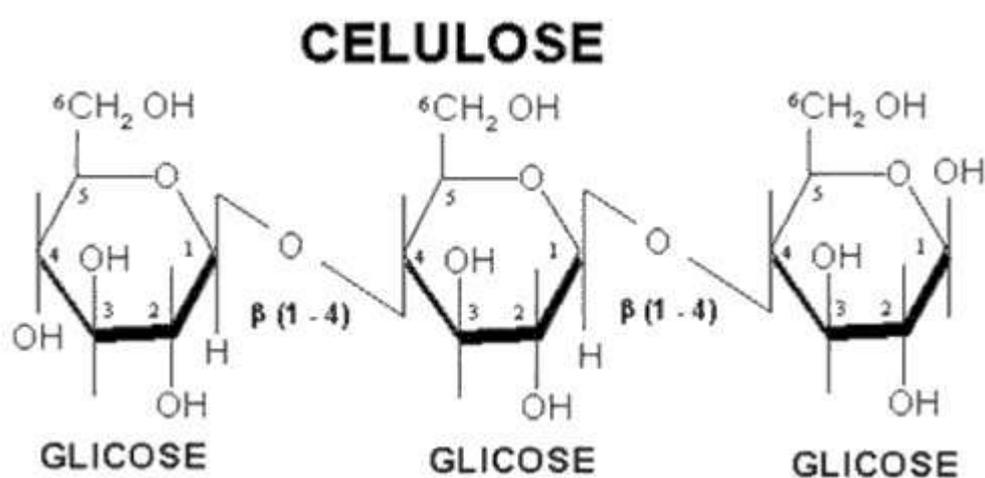
Fonte: Zampieri (2011).

### 3.4.1 Celulose

Na parede celular o componente que se apresenta em maioridade é a celulose, constituindo de 40% a 50% da massa seca do bagaço, (RABELO, 2010; SANTUCCI et al., 2015; SLUITER et al., 2016). Esta também é conhecida como o polissacarídeo mais abundante na natureza, uma vez que constitui a base estrutural das células das plantas.

Do ponto de vista químico, é um polímero de alta massa molecular composto exclusivamente de unidades de glicoses arranjadas em um plano, unidas através de ligações do tipo  $\beta$ -1,4-glicosídicas (Figura 10). Cada resíduo de glicose é rotacionado em  $180^\circ$  em relação à glicose precedente na mesma cadeia, o que confere à celulose uma conformação linear e estendida (SLUITER et al., 2016).

**Figura 10** – Estrutura da Composição da Celulose.



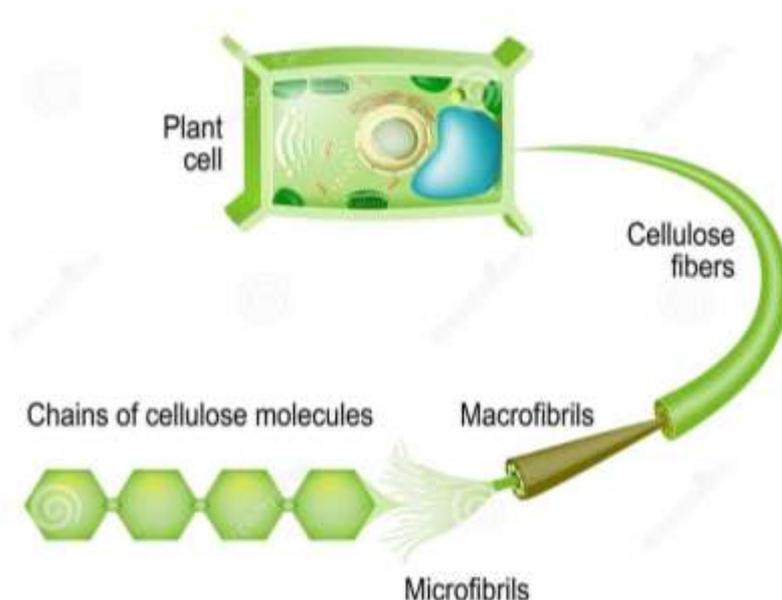
Fonte: Geocities.

Essa complexa formação da celulose faz dela resistente a tratamentos biológicos e químicos, insolúvel em água e na maioria dos solventes, sendo biodegradável quando despolimerizada (MONLAU, et al., 2013; TAHERZADEH ; KARIMI, 2008).

A celulose, ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ ), é classificada como um carboidrato e destaca-se por ser o polímero natural mais abundante da terra, sendo obtido a partir de fontes renováveis, com produção anual de mais de 50 bilhões de toneladas (SILVA et al., 2012).

A rigidez e sustentabilidade estrutural das paredes celulares dos vegetais é garantida por interações entre os polissacarídeos de celulose (Figura 11) reforçados dentro de uma matriz de hemiceluloses e pectinas. Essa sustentação estrutural é uma importante função da celulose que só se faz possível pela sua extrema insolubilidade em água sob condições normais (BANERJEE et al., 2016; OGEDA;PETRI, 2010).

**Figura 11** – Representação estrutural das paredes celulares dos vegetais por interações entre os polissacarídeos de celulose.



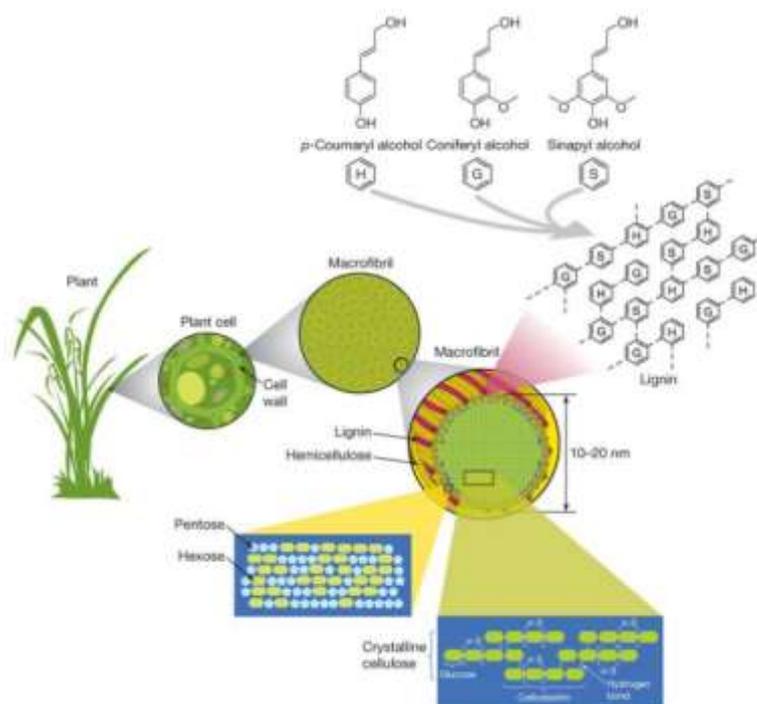
Fonte: Sabermas.

### 3.4.2 Hemicelulose

A hemicelulose é formada por uma complexa estrutura de até 200 carboidratos ramificados e adornados com grupos funcionais. É resultado da polimerização de diferentes pentoses (como xilose e arabinose), hexoses (como glucose, galactose,

manose) e ácidos urônicos (como ácido glucurônico e galacturônicos) (Figura 12) (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

**Figura 12** – Arranjo estrutural da conformidade da Composição da Hemicelulose.



Fonte: Rubin et al. (2008).

É estruturada por ligações não covalentes às fibrilas de celulose, agindo como uma matriz amorfa que segura as mesmas (BHOWMICK, SARMAH; SEN, 2017). A hemicelulose funciona como uma conexão entre as fibras de celulose e a lignina conferindo mais rigidez a rede celulose-hemicelulose-lignina (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Ao contrário da celulose, a hemicelulose tem uma estrutura amorfa e ramificada, conferindo a ela pouca resistência a hidrólise, sendo assim mais facilmente hidrolisáveis a seus monômeros (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Em

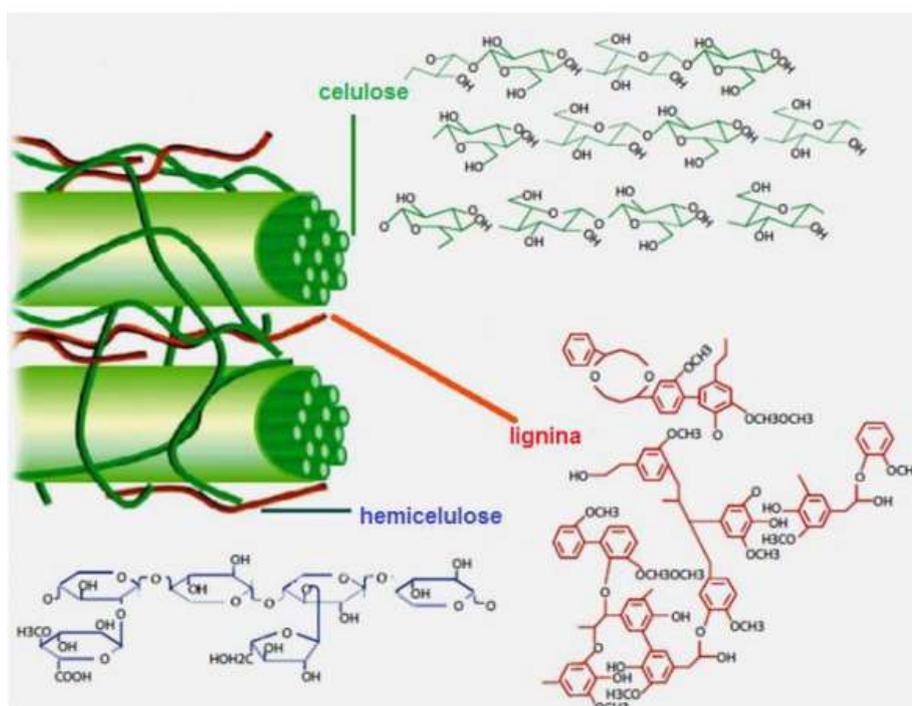
madeiras moles tem-se a predominância do monômero de manose na composição da hemicelulose, enquanto em madeiras duras e resíduos agrícolas predomina a xilose (MONLAU et al., 2013; OH et al., 2015).

### 3.4.3 Lignina

Depois da celulose, a lignina é a macromolécula mais abundante existente na biosfera. É definida como uma substância hidrofóbica, com estrutura tridimensional e amorfa, altamente ramificada (SILVA, 2011; ZHANG et al., 2014).

A lignina apresenta em sua estrutura inúmeros grupos aromáticos e alifáticos, com diversos anéis fenilpropânicos substituídos ligados por meio de diferentes tipos de ligações, como do tipo éter (hidroxilas primárias e secundárias) (figura 13).

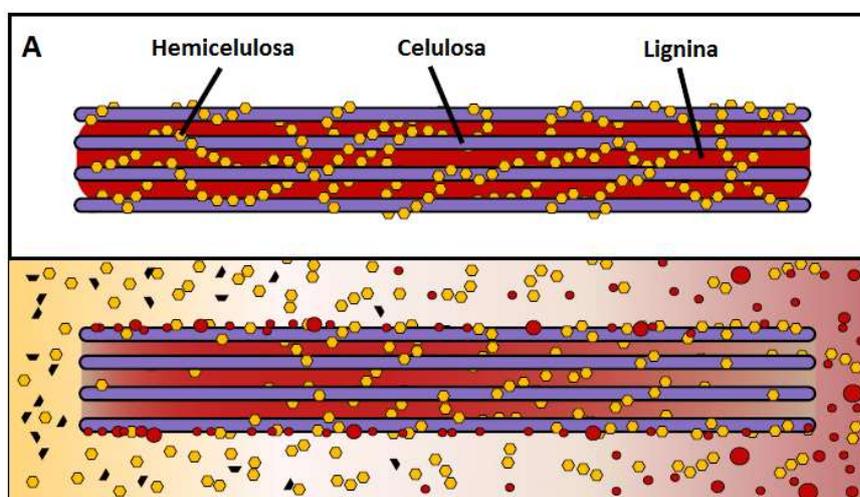
**Figura 13** - Arranjo estrutural da conformidade da Composição da Lignina



Fonte: Alonso et al. (2012)

A lignina age como concreto, preenchendo os espaços entre as estruturas da hemicelulose, cobrindo as microfibrilas de celulose (Figura 14), sendo considerada o principal composto recalcitrante na conversão da biomassa (PAUDEL et al., 2017; KUMAR et al., 2009). Dessa forma, o principal propósito da lignina é proporcionar rigidez estrutural, impermeabilidade e resistência contra-ataques microbiológicos e stress oxidativos (MONLAU et al., 2013; JORGENSEN, KRISTENSEN; FELBY, 2007).

**Figura 14** - Arranjo estrutural da conformidade entre Lignina , celulose e hemicelulose



Fonte: PAUDEL et al., 2017.

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

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

A lignina proporciona suporte mecânico e elástico, facilita o transporte de água e nutrientes pela planta e dificulta a entrada de patógenos microbianos (DAVISON et al., 2013).

Nota-se que é mais abundante em plantas menos lenhosas, garantindo maior resistência à ataques contra sua integridade estrutural. Tal resistência é um dos maiores obstáculos para o aumento da acessibilidade à celulose, pois a lignina atua como uma barreira física e química para a ação de enzimas celulolíticas (PALONEN, 2004).

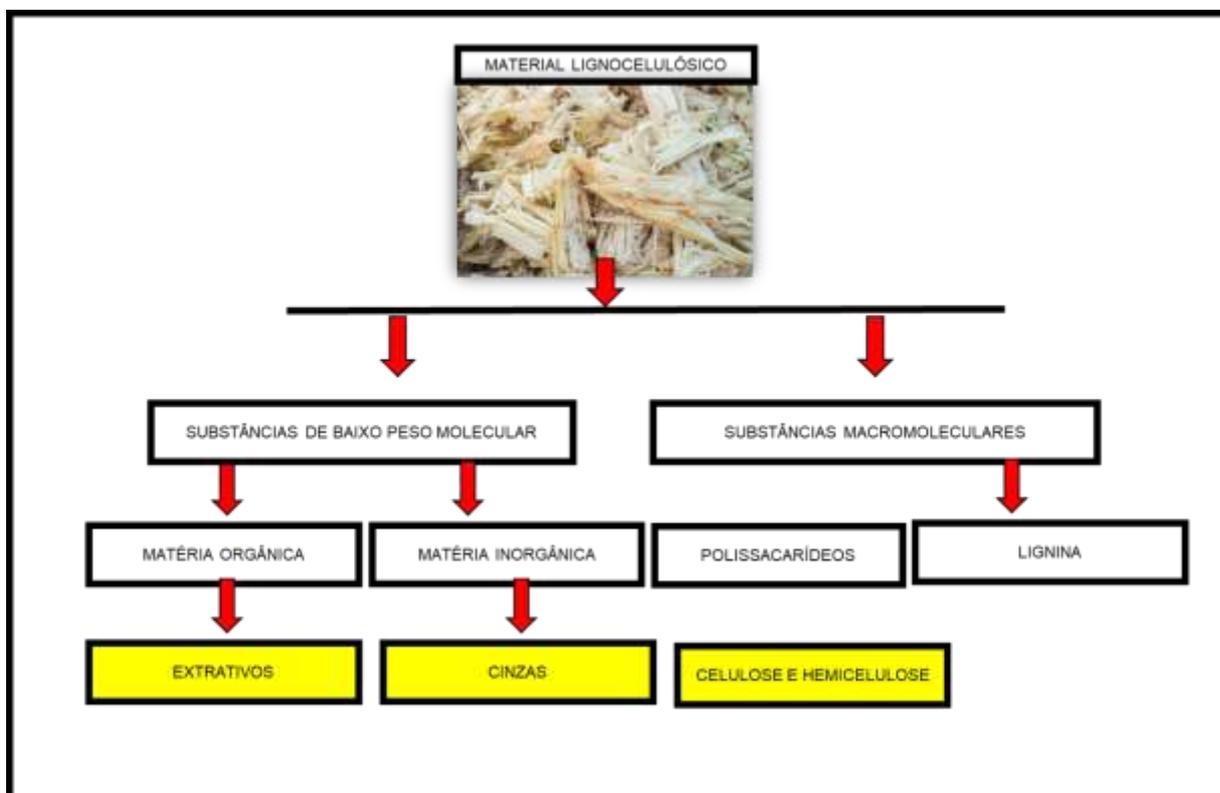
Apesar de não ser desejável em processos de conversão da celulose, pois bloqueia o acesso à celulose, a lignina pode ser utilizada na produção de aditivos de cimento, antioxidantes, nano tubos de carbono, resinas, aditivos de combustíveis, lubrificantes, emulsificantes, floculantes, dispersantes, tintas, corantes e graxas (GUERRIERO et al., 2016).

#### **3.4.4 Extrativos e Cinzas**

Na composição de materiais lignocelulósicos tem-se substâncias referentes a diferentes compostos químicos de baixa massa molar, divididos em material orgânico e inorgânico (Figura 15). O material orgânico se refere a compostos que podem ser

extraídos da matéria lignocelulósica pelo tratamento com solventes polares e apolares em estreitas faixas de temperatura.

**Figura 15** - Composição do Material Lignocelulósico: Extrativos, cinzas e substâncias macromoleculares



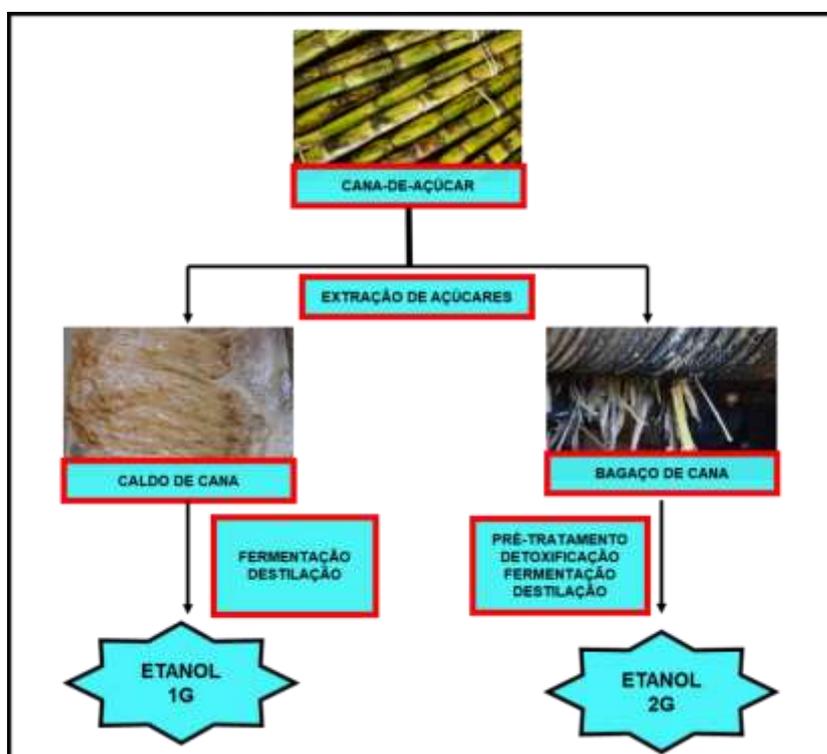
Fonte: Elaboração Própria.

Os principais compostos orgânicos entre os extrativos são: compostos fenólicos (taninos), terpenos, ácidos graxos saturados e insaturados, proteínas e flavonoides. Já o material inorgânico se refere a substâncias não passíveis de extração, determinadas como cinzas após a combustão da fração orgânica. Compreendem principalmente sais e óxidos de Ca, K, Mg, Mn, Na e SiO<sub>2</sub> (FENGEL; WEGENER, 1989).

### 3.5 Etanol de Segunda Geração

O processo de obtenção do etanol convencional, ou de primeira geração é baseado na reserva energética da cana, a partir do caldo rico em sacarose, no qual os açúcares encontram-se disponíveis para a fermentação. Diferentemente, os materiais lignocelulósicos, que representam a parte estrutural da planta, apresentam uma formação complexa constituída pela interação físico-química dos seus macrocomponentes principais: a celulose, as hemiceluloses e a lignina, evidenciando assim a utilização de etapas adicionais no processo de etanol 2G. (Figura 16) (SANTUCCI, 2018).

**Figura 16** – Fluxograma comparativo da Produção de etanol 1G e 2G, demonstrando as etapas diferenciadas dos processos.



Fonte: Elaboração Própria.

Para a produção de etanol de segunda geração tem uma sequência de processos para a desestruturação da matriz lignina-carboidratos e a hidrólise em açúcares passíveis à fermentação. A eficiência deste processo é dependente do conhecimento das características destes materiais, assim como de seu comportamento frente a uma série de tratamentos de natureza química, física, mecânica ou biológica.

Também é conhecido como etanol lignocelulósico pode ser obtido não apenas do bagaço ou palha da cana-de-açúcar, mas também do bagaço de sorgo, palha do milho, beterraba, e matérias primas ricas em fibras como o caso da cana-energia e do sorgo biomassa. (NOGUEIRA, 2008).

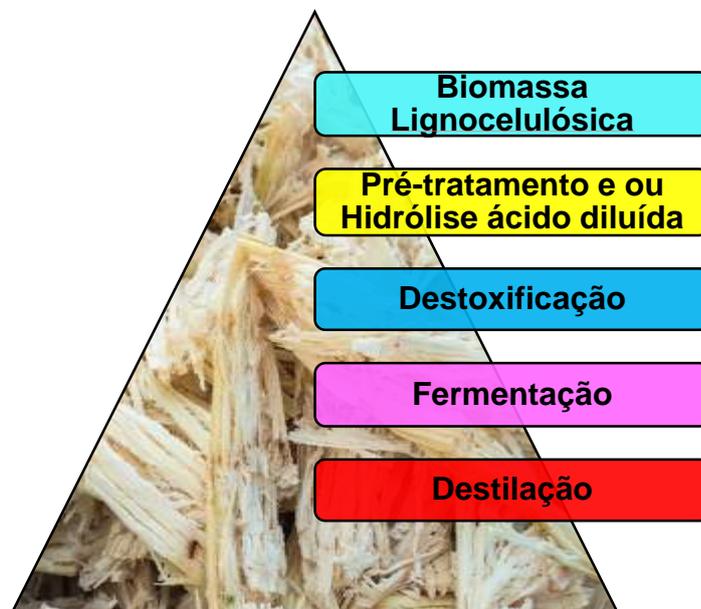
Sendo assim, uma alternativa para ampliar a produção do etanol no Brasil, sem ter de investir diretamente em aumento da área e de matéria-prima, por conta do aproveitamento de resíduos como, a palha, bagaço da cana, resíduos florestais, etc. (UNICA, 2013).

### **3.6 Etapas do processo de etanol de segunda geração**

A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos é basicamente fundamentada em quatro etapas, com distintas possibilidades de combinação (SUN; CHENG, 2002): pré-tratamento, destoxificação, fermentação (Licor hidrolisado e bagaço através da hidrólise enzimática) e destilação (Figura 17).

Esses processos disponibilizam os açúcares contidos, e os tornam passíveis de fermentação e transformação em etanol lignocelulósico, porém as unidades produtoras deste biocombustível ainda necessitam de aprimoramentos dos processos para maior rentabilidade.

**Figura 17** – Fluxograma demonstrativo das principais etapas para obtenção do etanol 2G.



Fonte: Elaboração Própria.

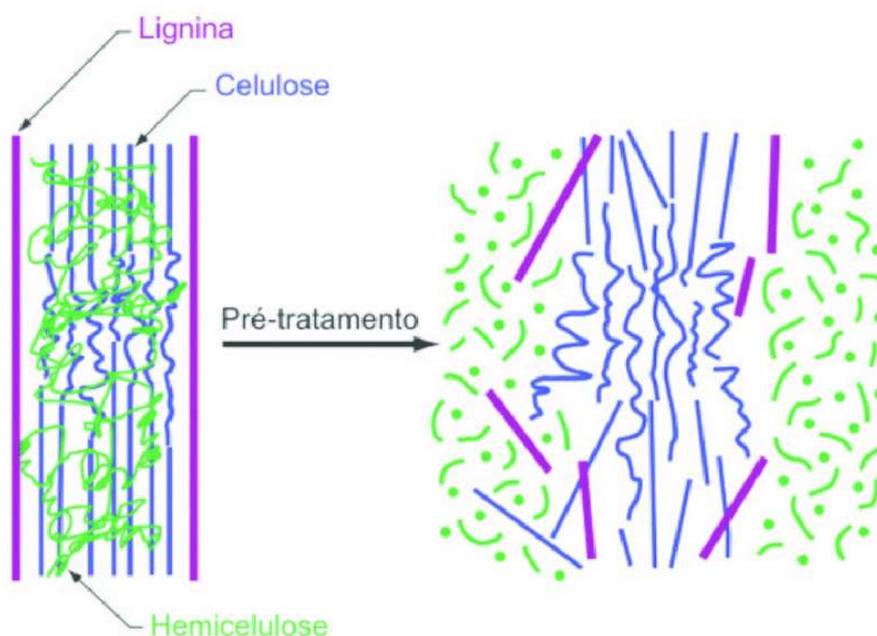
### 3.7 Pré-tratamentos aplicados nas biomassas lignocelulósicas

Uma das etapas para a obtenção de etanol 2G, baseia-se em disponibilizar primeiramente os açúcares contidos nas matérias-primas lignocelulósicas sendo esta conhecida como: pré-tratamento.

A estrutura química da biomassa lignocelulósica é formada por um complexo de celulose, hemiceluloses e lignina, altamente organizados e recalcitrantes, o que impede a conversão direta desses materiais em outras substâncias. Diante disso, faz-se necessário a inserção do pré-tratamento da biomassa, que visa aumentar a acessibilidade da mesma por parte dos microrganismos nos bioprocessos. (ALFENORE et al., 2016).

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

**Figura 18** – Ilustração do desarranjo provocado pelo processo de pré-tratamento em materiais lignocelulósicos.



Fonte: Santos, 2013.

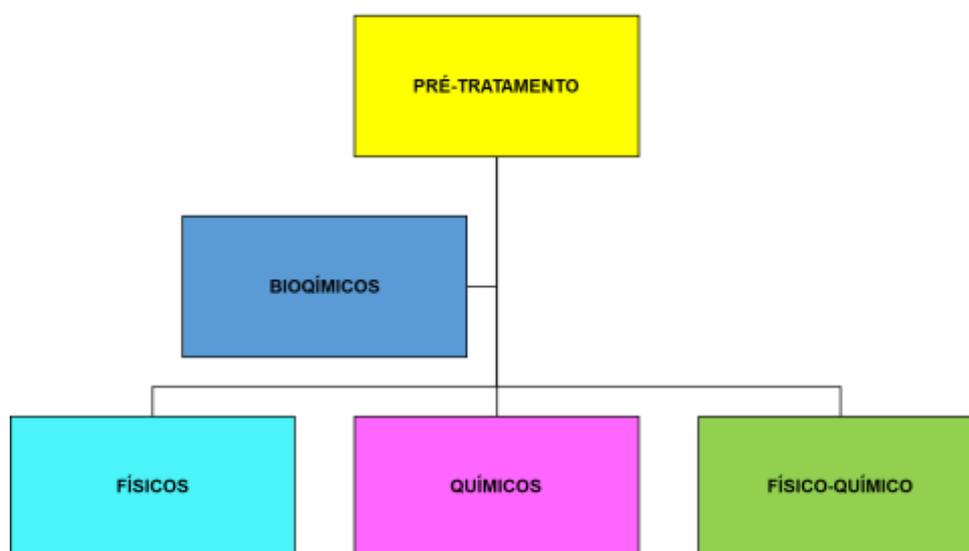
Esta etapa visa reduzir o grau de cristalinidade da celulose, dissociar o complexo lignina-celulose, aumentar a área superficial da biomassa, preservar as

pentoses maximizando os rendimentos em açúcares e evitar ou minimizar a formação de compostos inibidores do processo tanto na etapa de hidrólise quanto na etapa de fermentação (HSU, 1996 apud RABELO, 2010).

A eficiência deste processo de conversão é dependente de inúmeros fatores intrínsecos à biomassa que a deixa mais ou menos recalcitrante às enzimas e aos microrganismos fermentadores.

O rendimento também é dependente dos diversos processos contidos no pré-tratamento, com diferentes efeitos e a escolha do mais adequado depende da biomassa empregada e podem ser classificados em quatro grupos principais: físico-mecânicos, químicos, físico-químicos ou bioquímicos (Figura 19).

**Figura 19** – Esquema ilustrativo das diferentes formas de condução do processo de pré-tratamento na produção de etanol lignocelulósico .



Fonte: Elaboração Própria.

Uma vez que cada um destes possui características favoráveis e desfavoráveis, algumas publicações ainda dissertam a respeito das vantagens das combinações entre estes no intuito não só de aumentar a probabilidade de interações entre as fibrilas celulósicas e as enzimas degradadoras, como também de garantir a recuperação dos derivados hemicelulósicos e da lignina nas demais correntes de processo, ambos com características adequadas para a obtenção de outros produtos de maior valor agregado (ALVIRA et al., 2010; CANILHA et al., 2012; GALBE; ZACCHI, 2007; MENON; RAO, 2012; SUN et al., 2016).

A eficiência do pré-tratamento é avaliada tanto na composição físico-química da biomassa quando no seu desempenho durante a etapa de hidrólise enzimática.

Em geral, um bom pré-tratamento proporciona altos rendimentos e conversões de hidrólise, não gera inibidores da fermentação, tem baixo custo, não apresenta perda de carboidratos ou degradação da biomassa, possibilita a recuperação da lignina e consome pouca energia (SILVA et al. 2013).

Entretanto dificilmente os pré-tratamentos apresentarão todas essas características. Há alguns requisitos econômicos e ambientais que também devem ser levados em consideração, para que seja eficaz, como evitar a degradação da celulose e dos açúcares liberados na reação.

Deve-se também evitar a formação de possíveis inibidores, que afetam negativamente sobre enzimas hidrolíticas e os microrganismos em fermentação; permitir a recuperação da lignina e de outros coprodutos de maior valor agregado.

Minimizar a demanda energética; reduzir os custos de operação; reduzir o custo com materiais de confecção dos equipamentos de pré-tratamento; consumir pouco ou nenhum reagente químico; e produzir pequena ou nenhuma quantidade de resíduos

(ALVIRA et al., 2010; CANILHA et al., 2012; GALBE; ZACCHI, 2007; MENON; RAO, 2012; SUN et al., 2016).

Portanto, a escolha do método, assim como das condições de processamento empregadas, é baseada nas características iniciais do substrato e que se desejam alterar.

Os tratamentos físico-mecânicos promovem a ruptura da estrutura da parede celular tanto por fenômenos de corte quanto de quebra, fibrilação, deLAMIação e irradiação, enquanto mantêm os constituintes químicos inalterados (JIANG et al., 2016).

Deste modo, tem-se o aumento da área superficial específica acessível do substrato lignocelulósico pela redução das dimensões das fibras, pelo aumento da porosidade total ou ainda pela ruptura da regularidade estrutural; em alguns casos ainda são reportadas a quebra do arranjo cristalino da celulose e a redução de seu grau de polimerização (SUN et al., 2016).

Entre os diferentes tipos de tratamentos físicos estão os métodos de cominuição mecânica (picagem, esmerilhamento e moagem), de refino e de irradiação (SUN et al., 2016).

Uma vez que estes pré-tratamentos não alteram a composição da parede celular e não requerem a adição de reagentes químicos, apresentam a vantagem de promover a abertura da estrutura sem que haja a degradação da lignina e dos carboidratos, portanto a formação de compostos inibidores; ademais, não envolvem custos associados à recuperação de reagentes e tratamento de efluentes, logo são considerados “ambientalmente amigáveis” (CANILHA et al., 2012).

Entretanto, um consumo energético consideravelmente alto é requerido para a produção de substratos que alcancem altas taxas e rendimentos de hidrólise enzimática, o que diminui o interesse econômico nestes tipos de processamento (ALVIRA et al., 2010; CANILHA et al., 2012; GALBE; ZACCHI, 2007; MENON; RAO, 2012; SUN et al., 2016).

Os pré-tratamento químicos são processos que envolvem a quebra da matriz lignina- carboidratos, a solubilização seletiva – parcial ou total – dos componentes não celulósicos ou ainda o intumescimento da parede celular pelo uso de ácidos, bases, solventes (orgânicos ou iônicos) ou reagentes oxidantes. Como consequência, há o aumento do volume de poros e da área superficial total acessível das enzimas aos polissacarídeos (ALVIRA et al., 2010).

Quando o método provoca a solubilização das hemiceluloses e da celulose menos ordenada, é observado o aumento do grau de cristalinidade, como é o caso do tratamento com ácidos diluídos; já métodos que acarretam no intumescimento e no rompimento da estrutura cristalina, como o uso de ácidos concentrados, álcalis e líquidos iônicos, implicam na redução do grau de cristalinidade (SUN et al., 2016).

Entre as variáveis controladas dos processos estão a temperatura da reação, o tempo, o pH e a concentração dos reagentes, que se relacionam diretamente com sua severidade. Em geral, são os métodos mais viáveis economicamente pela simplicidade de execução e menor consumo energético. Contudo, condições mais severas de reação podem ocasionar a degradação da celulose, a desidratação dos açúcares liberados no meio reacional além da alta formação de compostos fenólicos. Problemas associados à corrosão de equipamentos, ao manuseio da corrente líquida, à recuperação e reciclo de reagentes e ao tratamento de efluentes são outras

importantes restrições ao processo (ALVIRA et al., 2010; CANILHA et al., 2012; GALBE; ZACCHI, 2007; MENON; RAO, 2012; SUN et al., 2016).

Os tratamentos físico-químicos são métodos que combinam as ações dos processos químicos e físicos, ou seja, promovem a quebra das ligações do complexo ligninacarboidratos, a despolimerização e solubilização parcial dos componentes não celulósicos, a separação dos feixes de fibras e a ruptura física da estrutura das fibras (MENON; RAO, 2012).

Logo, aumentam a digestibilidade enzimática das biomassas pelo crescimento expressivo da estrutura porosa, pela redução das partículas e pela delaminação e intumescimento da parede celular. Para isto, fazem uso de elevadas temperaturas e/ou pressões (ALVIRA et al., 2010).

Entre os principais parâmetros controlados estão o tempo de residência no reator, a temperatura, a pressão, a aplicação ou não de vapor, e a concentração do reagente (no caso de processos catalisados) (ALVIRA et al., 2010).

Os tratamentos físico-químicos são considerados os métodos de maior eficiência energética e ambiental, dentre os quais os mais amplamente estudados e aplicados são os de explosão a vapor e o hidrotérmico – ambos processos autocatalíticos, a explosão das fibras com amônia (ammonia fiber explosion, AFEX), o micro-ondas (assessor aos tratamentos químicos) e o supercrítico catalisado com CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>). Com exceção dos processos catalisados (AFEX e SC-CO<sub>2</sub>), não exigem a adição de outros reagentes químicos, portanto não acrescentam a etapa de neutralização da corrente líquida (CANILHA et al., 2012).

Quando realizados em condições brandas de reação, a concentração de inibidores formados é relativamente baixa, logo permitem a recuperação em grande

porcentagem dos carboidratos. A maior desvantagem destes processos está associada ao alto custo de instalação das unidades operacionais (ALVIRA et al., 2010; CANILHA et al., 2012; GALBE; ZACCHI, 2007; MENON; RAO, 2012; SUN et al., 2016).

Os pré-tratamentos bioquímicos são uma alternativa aos processos químicos, onde microrganismos ou enzimas isoladas são aplicados para a modificação da composição da biomassa pela degradação seletiva ou da lignina ou dos polissacarídeos (SUN et al., 2016).

Fungos de bolor marrom e suave são utilizados quando o intuito é a digestão dos polissacarídeos, porém com mínimo efeito sobre a lignina. Já os fungos de bolor branco (*Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoreus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pleurotus ostreatus*) são os mais amplamente aplicados pela maior efetividade na degradação da lignina pela ação das enzimas laccases, lignina-peroxidases e manganêsoxidases (SUN et al., 2016).

Algumas bactérias (*Pseudomonas* e bactérias filamentosas como *Actinomycetes*) também têm sido utilizadas com a finalidade de deslignificação. Alguns fungos de bolor branco também secretam enzimas que atacam os polissacarídeos, o que sugere a aplicação das enzimas lignolíticas isoladas como forma de evitar a perda dos açúcares de interesse (CANILHA et al., 2012).

São processos de baixo consumo energético, de condições brandas de reação e ambientalmente amigáveis; entretanto, são requeridos longos tempos de pré-tratamento (em torno de semanas) e condições controladas de crescimento, o que limita sua aplicação industrial; mesmo a eficiência da remoção da lignina é baixa

quando comparada aos métodos químicos (ALVIRA et al., 2010; CANILHA et al., 2012; GALBE; ZACCHI, 2007; MENON; RAO, 2012; SUN et al., 2016).

Os vários métodos de pré-tratamentos existentes diminuem a recalcitrância dos materiais lignocelulósicos por modos de ação distintos; no entanto, a maioria destes processos superam apenas alguns dos fatores que restringem a atuação enzimática.

Deste modo, combinações entre pré-tratamentos são muitas vezes consideradas para maximizar a digestibilidade da celulose e a produtividade total de açúcares fermentescíveis. Todavia, os custos associados à adição de mais de uma etapa no processo devem ser compensados pela recuperação e uso dos derivados hemicelulósicos e da lignina (AMORE et al., 2016; SUN et al., 2016).

### **3.8 Pré-tratamento Ácido Diluído**

O pré-tratamento ácido também é conhecido de pré-hidrólise, promovendo a hidrólise das hemiceluloses a outros polissacarídeos e monossacarídeos, como xilose, manose, galactose, glicose, entre outros (FREITA et al. 2014a).

Como as hemiceluloses são constituídas principalmente de xilana, o principal produto do pré-tratamento ácido é a xilose (CHEN et al., 2011).

A remoção da fração hemicelulósica torna a celulose mais acessível às enzimas da hidrólise (BALAT et al., 2008, BEHERA et al., 2014) o que, geralmente, resulta em bons rendimentos de hidrólise para este pré-tratamento (SINGHA et al., 2015).

Pré-tratamentos com ácido sulfúrico têm sido um dos mais utilizados devido a sua alta eficiência (CARDONA et al., 2010), mas também o ácido nítrico, clorídrico,

fosfórico (BEHERA et al., 2014), peracético e oxálico são opções comumente reportadas na literatura (SINGHA et al., 2015).

O pré-tratamento ácido pode ser conduzido em duas condições diferentes. A primeira que utiliza ácido concentrado não é tão atrativa quanto a segunda que utiliza ácido diluído, pois apresenta diversos problemas como formação de inibidores, toxicidade, corrosão e necessidade de equipamentos resistentes (SINGHA et al., 2015).

Já o tratamento com ácido diluído, em geral com concentração de ácido entre 0,1 e 2% (m.v<sup>-1</sup>), costuma ser mais efetivo pois apresenta menor degradação de açúcares e com isso menor formação de inibidores (BEHERA et al., 2014).

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

### **3.9 Destoxificação do licor lignocelulósico**

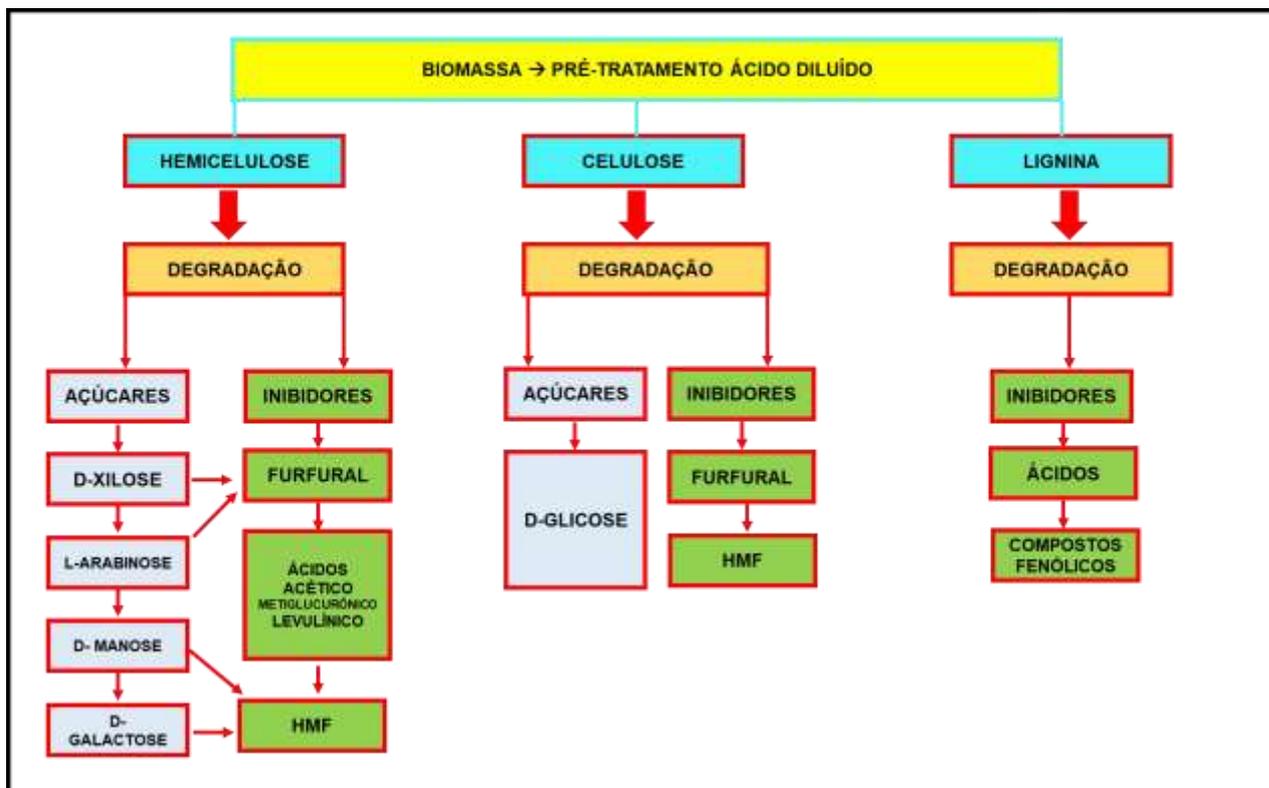
Alguns inconvenientes são apresentados quando se realiza o pré-tratamento por ácido diluído (pré-tratamento utilizado nesta pesquisa) (Figura 20). Um destes problemas é que quando ocorre a degradação da hemicelulose são liberados compostos como D-xilose, L-arabinose, açúcares importantes, no entanto também se tem a liberação de ácido acético, que são inibidores para alguns microrganismos. (PARAJÓ; ALONSO; SANTOS, 1996; PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1997;

PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ,1998; PALMQVIST; HAHN-HÂGERDAL, 2000).

Da quebra da celulose obtêm-se a D-glicose, e poderá ocorrer a degradação dos açúcares gerados dos segmentos da lignina, como D-xilose formando furfural da mesma forma que 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) (PALMQVIST e HAHN-HÂGERDAL, 2000).

Além disso, a degradação parcial da lignina resulta na liberação de compostos aromáticos denominados produtos derivados da lignina (PDL) ((PARAJÓ; ALONSO; SANTOS,1996; PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1997; PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ,1998). Entre estes compostos estão ácidos, e compostos fenólicos, sendo esta última classe formada também pela degradação de carboidratos (LARSSON et al.,2000).

**Figura 20** - Pré-tratamento de Biomassa lignocelulósica e os possíveis carboidratos e inibidores formados da degradação por ácido diluído.



Fonte: Elaboração Própria.

Para tanto é necessário que haja uma forma de remoção de tais compostos para se proceder o processo fermentativo, existe na literatura alguns métodos empregados com o objetivo de reduzir as concentrações dos compostos tóxicos gerados durante o pré-tratamento no hidrolisado ou até eliminá-los para a melhoria do processo fermentativo.

Todos os métodos aplicados atualmente ainda são passíveis de estudos, uma vez que não nenhum método consolidado, a maioria dos métodos emprega a alteração de pH combinada com a adsorção em carvão ativo. (ALVES et al., 1998; MARTON et al., 1998; MARTON et al., 2001; GINORIS, 2001).

Este procedimento com alteração do pH é conhecido como um processo de destoxificação do licor ao qual eleva-se o pH para 7,0 com óxido de cálcio comercial (leite de cal) e posteriormente adiciona-se ácido fosfórico até obter um pH de 4,0, seguido da adição do agente filtrante o carvão ativado (1%). Este licor tratado com estes compostos é então encaminhado a uma estufa pré-aquecida a 50°C na qual permanecerá por 30 minutos. Após o período encubado o licor será então centrifugado (Figura 21) para separar as partículas sólidas do licor e em seguida realiza-se a filtragem do licor (MARTON, 2006).

**Figura 21** - Método de Destoxificação por diferença de pH e carvão ativado (Marton, 2006).



Fonte: Elaboração Própria obtida da metodologia de Marton (2006).

Muitos estudos foram realizados levando em consideração a proposta de alteração de pH, concentração de carvão ativado e tempo de retenção, no entanto a mais concretizada foi a acima citada, estabelecida pelo autor Marton (2006).

(MARTON et al. (1998); ALVES et al. (1998); MARTINEZ et al. (2000); PARAJÓ et al. (1996); GINORIZ (2001)).

No entanto este processo de destoxificação do licor teve redução de no máximo 40% de alguns compostos, e reduções pequenas para ácidos e compostos fenólicos. (MARTON et al. (1998); ALVES et al. (1998); MARTINEZ et al. (2000); PARAJÓ et al. (1996); GINORIZ (2001)).

A definição de um tratamento adequado para a remoção ou redução da concentração de compostos tóxicos aos microrganismos contribuirá para favorecer a fermentação do hidrolisado. (FELIPE, 2004).

Outra metodologia mais recentemente proposta para a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar é a utilização de polímeros vegetais considerado, também, eficaz na remoção de compostos tóxicos, porém, menos eficiente em relação aos tratamentos com carvão e resina (SILVA, 2006).

No entanto o autor Silva-Fernandes *et al*, (2017), utilizando biopolímeros na destoxificação do licor de bagaço de cana encontraram reduções da ordem de 40% para compostos fenólicos.

A utilização de biopolímeros naturais acarreta uma porção de benefícios entre eles a colaboração de um processo de destoxificação com processo mais sustentável, além do que a não utilização do carvão ativado e a redução do tempo de retenção em estufa.

### 3.10 Método de Destoxificação Sustentável

O processo de destoxificação do licor visa melhorar o material a ser fermentado e torná-lo o mais puro possível. Sabe-se que o pré-tratamento resulta em açúcares pentoses e hexoses e também alguns inibidores da fermentação.

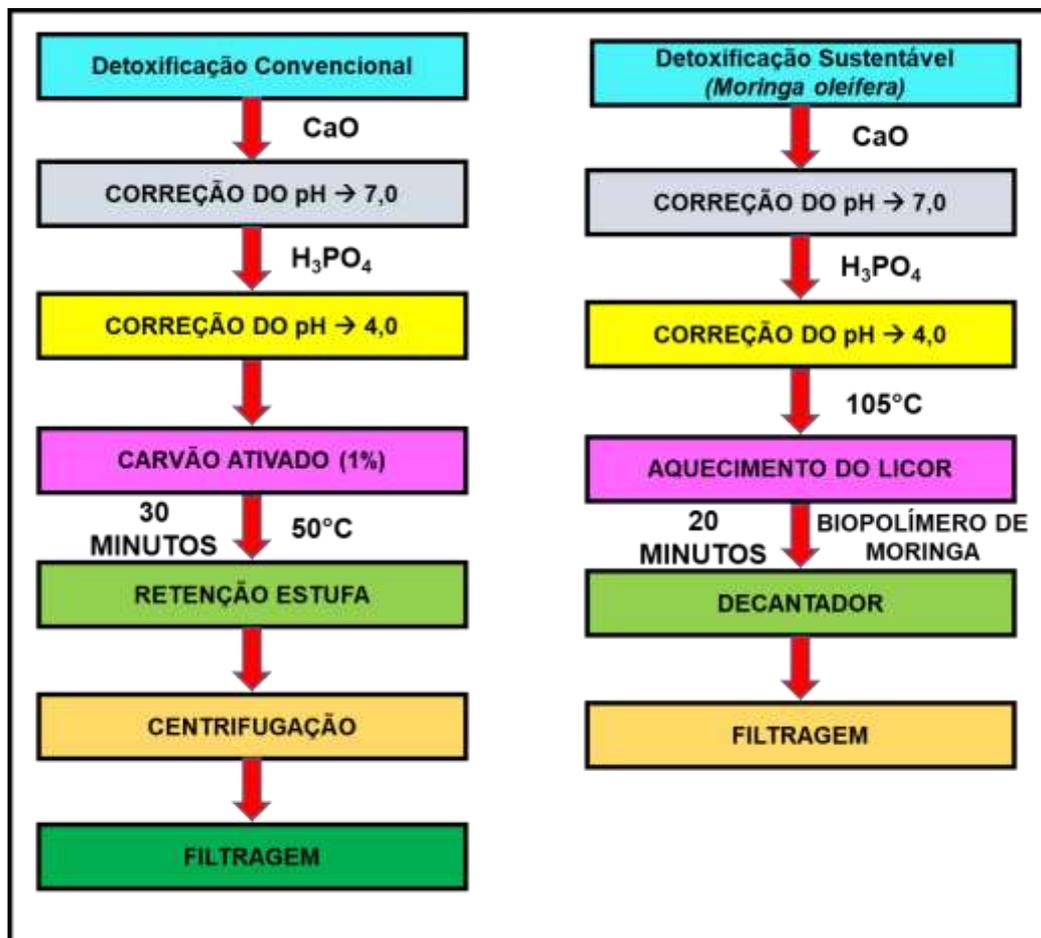
Uma grande melhoria para a produção de etanol 2G é se houvesse uma clarificação deste licor compatível ou similar a realizada para o processo de etanol 1G. Freita et.al (2017a), analisando biofloculantes que pudessem substituir os polímeros convencionais, teve resultados satisfatórios com o biopolímero de semente de *M. oleífera* Lam aplicada no processo de cana-de-açúcar, relatando assim um meio mais sustentável de clarificação do caldo de cana.

A aplicação de um processo sustentável e econômico e que possa trazer remoções significativas de compostos tóxicos durante o processo produtivo do etanol lignocelulósico, pode acarretar em melhorias significativas e até mesmo propostas que possam ser viabilizadas pelo setor com vantagens ambientais.

Além do que a destoxificação sustentável reduziria algumas etapas do processo, como o tempo de retenção na estufa em contrapartida do decantador de caldo, ao qual poderia ser aplicado também para o licor (Figura 22).

As metodologias de destoxificação ainda não estão consolidadas, porém são utilizadas em grande diversidade de trabalhos. A utilização de novas metodologias podem favorecer o setor sucroenergético, contribuindo para melhorias da eficiência fermentativa.

**Figura 22** - Processo de Destoxificação convencional do licor hemicelulósico e Processo sustentável com *M. oleífera* Lam.

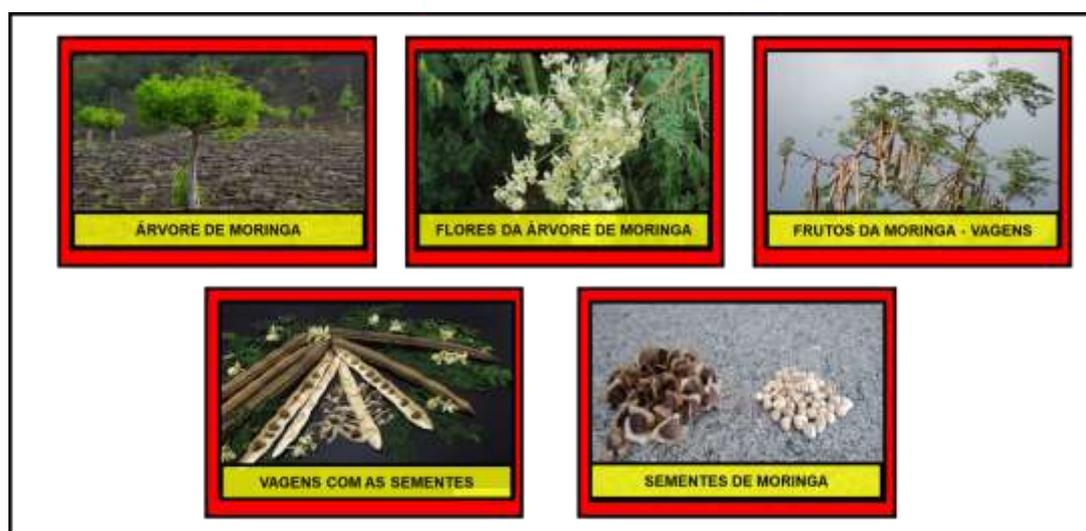


Fonte: Elaboração Própria.

### 3.11 Biofloculante de *M. oleífera* Lam

A *M. oleífera* LAM é uma espécie arbórea e perene, pertencente à família *M. oleífera* LAMceae, nativa do noroeste da Índia (Figura 23). Esta planta apresenta atividades coagulativas que a tornam promissora no tratamento de impurezas da água e também no processo de clarificação do caldo de cana (GUALBERTO, et al. 2014; FREITA et al. 2017).

**Figura 23** - Característica da Árvore de *M. oleífera* Lam.



Fonte: Elaboração Própria, imagens google.

Freita et al. (2017), relatou que o biofloculante das sementes de moringa teve resultados satisfatórios, ao ser comparado com o polímero comercial utilizado nas usinas de cana de açúcar, a observação dos autores se deve ao fato do biofloculante ter removido as impurezas presentes no caldo.

Segundo Poumaye, et al., (2012), o coagulante extraído das sementes da *M. oleífera* Lam se destaca dos coagulantes químicos por ser natural e biodegradável, sendo uma ferramenta importantíssima quando se considera prioritário o desenvolvimento sustentável.

Estas características são decorrentes das propriedades apresentadas por esta planta. Estudos recentes realizados por Ullah, et al., (2015) comprovaram a estabilidade térmica da *M. oleífera* Lam, sendo a temperatura de fusão de aproximadamente 98°C.

Estes autores descreveram também a presença duas proteínas de cadeia com alta sequência, com peso molecular de 3,5 e 7,5 KD, enquanto todas as outras cinco

proteínas floculativas encontradas, são de pequenas cadeias básicas com único peso molecular de aproximadamente 6,5KD.

A eficácia do processo de coagulação-floculação está diretamente relacionada à estas proteínas presentes nas sementes de *M. oleífera* Lam, e sua extração é maximizada quando se utilizam soluções salinas contendo  $\text{CaCl}_2$  (0,1 mol/L), podendo-se obter quantidades seis vezes maiores em relação à extração realizada somente com água (FREITA, et al., 2014).

Sua estabilidade somada a sua capacidade floculativa, torna a semente de *M. oleífera* Lam promissora no tratamento de águas de efluentes. Freita et al (2017), Costa (2015) e Macri et al (2014) citam a semelhança com polímeros comerciais, justamente por tais características.

### **3.12 Processo Fermentativo Lignocelulósico**

O preparo do meio adequado em função de determinado microrganismo, conduzido em dornas ou biorreatores, no qual se objetiva obter o produto desejado denomina-se processo fermentativo, e essas condições são as mesmas tanto na produção de 1G ou 2G. (VENTURA, 2015).

A fermentação é a etapa na qual ocorre a conversão dos açúcares em etanol e outros compostos indesejados por intermédio de reações metabólicas realizadas por microrganismos (SOUZA; MONTEIRO, 2011).

Para a produção de etanol de segunda geração o processo fermentativo, encontra obstáculos como a conversão da biomassa em etanol envolvendo a despolimerização da celulose e hemiceluloses em seus monômeros constituintes e a posterior fermentação desses açúcares (NAKASU, 2015).

Atualmente para a produção industrial de etanol de primeira geração utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como principal microrganismo utilizado a partir do caldo de cana-de-açúcar por sua habilidade de crescimento em altas concentrações de açúcar, elevada produtividade (VENTURA, 2015).

Embora alguns microrganismos utilizem a xilose como fonte de carbono (LIN, Y.; TANAKA, S., 2006), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é incapaz de fermentar este açúcar, um dos principais constituintes da fração hemicelulósica dos materiais lignocelulósicos (NAKAMURA; SAWADA; INOUE, 2001).

Os microrganismos que consomem pentoses com taxas de fermentação maiores e com menor tolerância aos inibidores de fermentação quando assimilam xilose em vez de glicose, se faz cada dia mais notável (LI et al., 2015). Assim, o isolamento, a identificação e a caracterização de leveduras nativas fermentadoras de xilose têm recebido grande atenção nos últimos anos (CADETE et al., 2009; CADETE et al., 2013; JEFFRIES et al., 2007; KRAHULEC et al., 2012; NGUYEN et al., 2006; WOLHBACH et al., 2011).

Um microrganismo que se enquadra nesse processo fermentativo do etanol lignocelulósico é a levedura *P. kudriavzevii*, anteriormente conhecida como *Issatchenkia orientalis* e *Candida krusei*, com capacidade de fermentação de pentoses e hexoses (TRALLI, 2019; PAGNOCCA, 2015).

Segundo Isono *et al.* (2012), esta levedura apresenta melhores processos de exportação de ácidos orgânicos e o pH intracelular, sendo mais eficaz do que a *Sacharomyces cerevisiae*.

Tralli (2019), em estudos com esta cepa de levedura identificou sua melhor condição no processo fermentativo no licor hemicelulósico estando estabelecidos em

37°C em um pH de 3,5, demonstrando uma melhor condução do processo no consumo de açúcares de pentoses e hexoses.

Existem outras leveduras com capacidade de fermentar pentoses como a *Pichia membranifaciens* que tem condições ideais para fermentação de pentoses a uma temperatura de 32 °C e pH 4,0-4,5. Cabe destacar que cada microrganismo tem uma faixa de melhor atuação e consumo de xilose, permitindo assim uma maior produção de etanol, menor produção de compostos secundários e altos índices de viabilidade celular durante a fermentação (RIBEIRO, et.al, 2019).

Outra condição importante para que se ocorra o processo fermentativo é a concentração de açúcares. É necessária uma quantidade ideal de açúcares, e esta não pode se exceder, porque assim poderá ocorrer o estresse das estirpes, e nem tão pouca para que não se tenha apenas o processo de respiração, por isso a concentração destes açúcares tem sempre que ser controlada, para que os microrganismos, consigam desdobrá-los, e finalizem o processo fermentativo com o esgotamento dos mesmos. No material lignocelulósico é constituído de pentoses (5C) e hexoses (6C), e para que haja o desdobramento destes açúcares é necessário que o microrganismo utilizado possua esta capacidade.

### **3.13 Levedura *P. kudriavzevii***

A estirpe de levedura *P. kudriavzevii*, tem se mostrado promissora na fermentação de pentoses e hexoses (PAGNOCCA, 2015). Este fato se dá pela sua adaptação ao meio hemicelulósico e também aos processos de exportação de ácidos orgânicos e o pH intracelular mais eficaz quando comparado a *Sacharomyces*

*cereviseae*, neste meio fermentativo de etanol de segunda geração (ISONO et al. 2012).

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

Estudos realizados por Tralli (2019), sobre as melhores condições fermentativas de pH, temperatura e concentração de nutrientes, demonstraram que a levedura *P. kudriavzevii*, quando submetida a pH 3,5 e temperatura de 37°C sem adição de nutrientes ao meio lignocelulósico, mantém as células viáveis por um maior período de tempo, produzindo concentrações superiores de etanol e consequentemente baixos níveis de glicerol e ácido acético.

Tralli (2019), ainda descreve que a viabilidade das células nessas condições fermentativas (pH 3,5 e temperatura de 37°C) são superiores a 70% nas primeiras 24 horas do processo. O relato desta autora foi a base para o presente estudo, uma vez que Harinder et al. (2012), e Oberoi et al. (2012), fermentando a mesma cepa, porém com valores de pH e temperatura diferenciados (pH 4,0 e temperatura de 34°C), perceberam uma viabilidade similar apenas nas primeiras 12 horas, com queda após este período.

Esta estirpe é uma nova cepa que surge para o processo fermentativo do aproveitamento de resíduos lignocelulósicos, e sua faixa de temperatura demonstra

uma condição de viabilidade celular tolerável pode não ser a mesma conhecida para uma linhagem *Sacharomyces cerevisiae* (NUTTAPORN *et al.* 2018).

### **3.14 Os desafios do Etanol Lignocelulósico**

O Brasil possui duas plantas comerciais de etanol de segunda geração (Granbio e Raízen) e uma experimental (Centro de Tecnologia Canavieira - CTC), com capacidade de produção nominal de 82, 42 e 3 milhões de litros, por ano, respectivamente (ÚNICA, 2020).

Um dos desafios relatados por estas unidades funcionais foram os problemas técnicos com as etapas de pré-tratamento e destoxificação, além da filtragem com a lignina (GRANBIO, 2018).

Diversos fatores influenciam a conversão da biomassa lignocelulósica nos açúcares para fermentação. Entre estes fatores, podemos citar a acessibilidade à celulose, lignina e hemicelulose para a hidrólise enzimática (BRIENZO *et al.*, 2016), e o alto custo das tecnologias utilizadas nos processos de conversão (LANGE *et al.*, 2007).

Características do próprio substrato podem aumentar ou diminuir a acessibilidade, como a cristalinidade, o grau de polimerização e a heterogeneidade estrutural, que causa a presença de estruturas mais recalcitrantes ou até inacessíveis (CHANDRA *et al.*, 2008).

Uma das maiores barreiras a ser ultrapassada é o limitado acesso a grande parte da celulose que está protegida pelo rígido e organizado conjunto de microfibrilas (ARANTES; SADDLER 2010).

A presença de lignina e hemicelulose também interfere na acessibilidade à celulose, alterando a distribuição de poros e a eficácia de pré-tratamentos e componentes enzimáticos (ESTEGHLALIAN et al., 2001).

Materiais lignocelulósicos são substratos heterogêneos e porosos, tendo área superficial dividida em externa e interna, cada uma com diferentes afinidades (CHANDRA et al., 2015).

A superfície interna pode ter acessibilidade medida pelas aberturas superficiais, fendas internas e espaços vazios criados pela retirada de componentes não-celulósicos como hemicelulose e lignina da parede celular. Este efeito é provocado por pré-tratamentos que se utilizam diversos métodos como explosão a vapor, ácido diluído, alcalino, peróxido etc (STONE et al., 1965).

A remoção da hemicelulose é considerada um fator mais impactante na acessibilidade à celulose do que a deslignificação do material para alguns autores (LEU; ZHU, 2013).

As hemiceluloses atuam como uma barreira física que dificulta hidrólise enzimática pelo fato de estarem alojadas entre e envolvendo as microfibrilas de celulose nas paredes celulares secundárias (ZHU et al., 2010).

No processo de destoxificação há problemas com os interferentes do processo fermentativos, formados na quebra do material lignocelulósico, necessitando de melhorias para um maior rendimento fermentativo.

Espera que vencidas essas barreiras as projeções, possam ser fundamentadas para as quais julgou-se mais econômica e competitiva, a integração da produção de etanol lignocelulósico com a convencional. As usinas que já possuem cogeração e tiverem interesse em produzir etanol lignocelulósico, deverão avaliar a disponibilidade

e diversidade de matéria-prima (recolhimento de palhas e pontas e a possibilidade de cana-energia) (ÚNICA, 2020).

A produção de etanol 2G utilizará apenas pequena parcela do bagaço e da palha produzidos, e deverá ser significativa somente no final do período, atingindo cerca de 600 milhões de litros em 2026. A estimativa dos investimentos em novas plantas de etanol lignocelulósico considerou os valores das unidades comerciais em operação no Brasil. (RENOVABIO, 2019).

É importante destacar a Plataforma Biofuturo, lançada na COP22, que representa um novo esforço coletivo para acelerar o desenvolvimento e a implantação de biocombustíveis avançados e biomateriais, como alternativas sustentáveis aos combustíveis fósseis. A iniciativa conta com a participação de 20 países relevantes no cenário mundial e dá seguimento aos compromissos estabelecidos nos acordos internacionais, incluindo o de Paris (BIOFUTURE PLATAFORM, 2017; RENOVABIO, 2019).

## **4.0 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Instalação e condução do experimento**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Açúcar e do Alcool e Microbiologia das Fermentações, do Departamento de Tecnologia, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, campus de Jaboticabal – SP, em parceria com o Laboratório de Biotecnologia, na Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP, campus de Lorena - SP.

O genótipo de sorgo biomassa utilizado foi o Palo Alto N52K1009. A pesquisa foi instalada na área experimental da FCAV/UNESP de Jaboticabal-SP, no Departamento de Produção Vegetal-UNESP na safra 2018/2019.

A cultura foi instalada no sistema de plantio direto, utilizando-se semeadora de 5 linhas, com taxa de 08 a 09 sementes por metro linear e espaçamento de 0,45 metros entre linhas, obtendo-se um estande final de 130.000 a 140.000 plantas. ha<sup>-1</sup>. Foram realizadas adubações no plantio e de cobertura. Durante o desenvolvimento do experimento, o tratamento fitossanitário foi priorizado, objetivando-se garantir a sanidade da cultura.

A adubação do plantio constituiu-se da aplicação de 36-126-72 kg.ha<sup>-1</sup> de N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> K<sub>2</sub>O, utilizando-se 350 kg.ha<sup>-1</sup> da fórmula 8-28-16 mais micronutrientes.

Aos 120 d.a.s realizou-se a colheita manual dos colmos do sorgo biomassa, nesta ocasião foram coletados aproximadamente 200 colmos de sorgo integrais (colmos com folhas).

O genótipo de cana-energia foi a Vertix 3, cedida pelo grupo Tereos, unidade Cruz Alta, em Olímpia - SP, em parceria com a Granbio.

Para o controle das ervas daninhas foi realizado capinas manuais e aplicado produtos seletivos. A colheita foi realizada aos 12 meses da cultura, totalizando 250 colmos integrais.

#### **4.2 Delineamento Experimental**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com parcela subdivididas, em 4 repetições, sendo o tratamento principal o misturasgradativo de sorgo biomassa e cana-energia (SB:CE), nas proporções de 25:75%; 50:50%; 75:25% respectivamente e de 100 (CE)%, 100%(SB), e o tratamento secundário a destoxificação dos licores pelo método convencional, biofloculante de *M. oleífera* Lam e o licor sem destoxificação.

#### **4.3 Característica da Biomassa**

O sorgo biomassa Palo Alto é um genótipo de fácil adaptação por região agrícola e época de cultivo, aumentando as janelas de produção quando associado a cultura de cana-de-açúcar.

Este genótipo possui um ciclo de 120 dias após a semeadura, suas raízes profundas que chegam a quase 2 metros de profundidade (NEXSTEPPE, 2018).

Ele se caracteriza como uma cultura de crescimento rápido e pouca retenção de umidade, permitindo índices de 70 a 80 toneladas por hectare de massa verde produzida (NEXSTEPPE, 2018).

Para a cana-energia o seu plantio pode ser em áreas com baixa aptidão agrícola, ou seja, com limitações hídricas e de nutrientes, o que permite a exploração

de regiões desfavorecidas e o aumento da produtividade por hectare (GRANBIO, 2018).

Sua produtividade pode alcançar de 180 a 200 t/ha nos dois primeiros cortes, devido a espessura dos seus colmos serem bem mais finos em relação a cana convencional, seu teor de fibras é em torno de 25% (GRANBIO, 2018).

Outro ponto interessante desta variedade é que pragas como brocas tem uma intensidade de significativamente inferior comparadas a variedades comerciais de cana-de-açúcar comum (GRANBIO, 2018).

#### 4.4 Obtenção e Caracterização dos Bagaços

Os colmos da cana-energia e do sorgo biomassa foram colhidos manualmente. Após a colheita, procedeu-se a moagem em moenda de laboratório, obtendo-se, assim o bagaço. Seguido a colheita e a extração, o bagaço dos genótipos era desfibrado em aparelho com facas rotativas, para promover o rompimento dos tecidos e fibras que compõem a biomassa (Figura 24).

**Figura 24** - Colheita, Extração e Desfibramento do bagaço de Cana-Energia e Sorgo biomassa



Fonte: Elaboração Própria

A seguir os bagaços passaram pela etapa de secagem, para qual cada material foi disponibilizado em lonas plásticas abertas, garantindo a composição dos tratamentos (cana-energia e do sorgo biomassas isoladas), foram mantidos em local aberto em temperatura ambiente, para secagem (Figura 25). Por um período de aproximadamente 60 dias.

**Figura 25** - Secagem dos bagaços de cana-energia e sorgo biomassa.



Em seguida foram armazenados em saco plástico com o recipiente fechado, para futuras aplicações no processo de pré-tratamento.

A caracterização dos bagaços foi realizada no departamento de Engenharia Ambiental - Instituto de Geociências e Ciências Exatas (Câmpus de Rio Claro). A metodologia utilizada foi Norma Brasileira de Caracterização Química de Bagaço-de-cana-de-açúcar (ABNT, NBR 16550-2016).

#### 4.5 Obtenção dos Licores

O presente estudo foi realizado com biomassas distintas, cana-energia e sorgo biomassa. Para a condução do mesmo utilizou-se o planejamento processo industrial com a combinação das matérias-primas de maneira gradual experimental, considerando além da avaliação das biomassas isoladas e misturadas (Figura 26).

**Figura 26** - Condição experimental da cana-energia e do sorgo biomassa isolados e misturados para a entrada no biorreator de pré-tratamento. para disponibilização dos açúcares contidos nos bagaços.



Fonte: Elaboração Própria.

No entanto para se trabalhar com essas biomassas distintas havia a necessidade de estabelecer qual seria a melhor condição de pré-tratamento ácido-diluído no reator de hidrólise do bagaço.

Para tanto, utilizou-se como referência os estudos realizados de melhor condição de pré-tratamento em sorgo biomassa realizado por Freita (2017), que definiu a temperatura de 120°C por 20 minutos a uma concentração de 0,2%(m/v) de ácido sulfúrico e em palha de cana realizado por Rabelo et al (2011) 140°C por 15 minutos a uma concentração de 0,5%(m/v) de ácido sulfúrico. Cabe ressaltar que não há na literatura condições estabelecidas para a cana-energia.

Considerando estas verificações, realizou-se os testes de pré-tratamento em todas as proporções definidas neste experimento, ou seja, tanto a condição de Freitas (2017) como a condição de Rabelo et al (2011) foram aplicadas em todos os tratamentos estabelecidos neste estudo de maneira isolada e misturada, havendo assim os seguintes tratamentos:

-Cana-energia 100% (3 Kg de bagaço de Vertix 3);

-Sorgo biomassa 100% (3Kg de bagaço do Palo Alto);

-Cana-energia (50%) + Sorgo biomassa (50%) (1,5 Kg de bagaço da Vertix 3 e 1,5Kg de bagaço do Palo Alto);

-Cana-energia (25%) + Sorgo biomassa (75%) (0,750 Kg de bagaço da Vertix 3 e 2,250Kg de bagaço do Palo Alto);

-Cana-energia (75%) + Sorgo biomassa (25%) (2,250 Kg de bagaço da Vertix 3 e 0,750Kg de bagaço do Palo Alto);

Os bagaços de entrada no reator já eram preparados e homogeneizados nas proporções estabelecidas para este experimento, sendo que o peso total de entrada no equipamento era sempre de 3 Kg.

Após essa pesagem, adicionava-se o ácido sulfúrico, e a reação de pré-tratamento dos bagaços era realizada em um reator de aço inoxidável com capacidade de 40 L, situado na EEL/USP- Lorena. Ao final da reação, a fração líquida, correspondente ao hidrolisado hemicelulósico, foi separada da fração sólida (celulignina) por filtração. Obtendo-se assim as frações de licor de cada teste.

O licor e a condição de pré-tratamento utilizada foi a que disponibilizou maiores concentrações de açúcares em ambas as biomassas.

#### 4.6 Quantificação de Açúcares e Concentração Licor Hemicelulósico

Os hidrolisados foram encaminhados para a quantificação das características químico tecnológicas. Foram quantificados os teores de xilose e glicose totais por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC); Acidez total dos licores segundo CTC, (2009) 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 que ocorreu em um rotaevaporador de simples efeito a 60°C com sistema de vácuo a 635mmHg, objetivando aumentar a concentração dos açúcares fermentescíveis no meio.

#### 4.7 Tratamento do Licor – Destoxificação

O licor após procedimento de concentração de açúcares foi destinado ao processo de destoxificação e ocorreu de 03 formas distintas:

Processo convencional de Destoxificação: Inicialmente, os pH dos licores concentrados foram ajustados para 7,0 pela adição de Óxido de Cálcio (CaO), seguido de redução até pH 4,0 utilizando Ácido Fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Após esta etapa, o hidrolisado foi submetido a etapa de adsorção empregando-se 1% (m/v) de carvão ativo em incubadora a 50°C durante 30 min. Ao final de cada etapa de alteração de pH o hidrolisado foi centrifugado, recebendo a adição de carvão, e posteriormente filtrado (MARTON, *et al.* 2006).

Tratamento do Licor com *M. oleífera* Lam: Fez-se a correção do pH para 6,0 pela adição de óxido de cálcio (CaO), posteriormente os licores foram aquecidos até a fervura, e colocados no decantador laboratorial (sistema de luzes), onde adicionou-

se o extrato de *M. oleífera* Lam como agente flocculante (Freita *et al* 2017) por 20 minutos sendo filtrado a seguir.

Não Destoxificação dos licores: Para este tratamento não se utilizou qualquer processo de destoxificação ou tratamento.

#### **4.8 Levedura**

A levedura utilizada foi a *P. kudriavzevii* LJ3, pertencente ao banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia das Fermentações, do Departamento de Tecnologia, localizado na FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal–SP.

Este microrganismo foi utilizado devido as suas características de capacidade de desdobrar tanto glicose e como a xilose. Tralli (2019), em resultados preliminares em vias de publicação, definiu que sob condições de pH 3,5 à 37°C, a estirpe apresentou uma maior produção de etanol com menor geração de glicerol e ácido acético.

Para tanto esta condição foi utilizada no presente estudo, baseada nos resultados de Tralli (2019), que sugerem o alto potencial desta cepa de *P. kudriavzevii* na produção de etanol de segunda geração.

#### **4.9 Preparo do Inóculo**

A levedura *P. kudriavzevii*, estava armazenada em condições de congelamento com meio adicionado de glicerol em freezer a -70°C e o uso do nitrogênio líquido.

Para a ativação e crescimento de massa celular a levedura foi inoculada com uma alça de platina em erlenmeyers com 200 mL de meio YPXD contendo 20 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 10 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 10 g.L<sup>-1</sup> de xilose.

Os frascos foram incubados por 72 horas à 37°C sob agitação orbital (125 RPM). Ao final deste período o meio de cultura foi centrifugado, descartando-se a fração líquida. A massa celular obtida foi suspensa em salina e armazenada à 4°C, todos os procedimentos foram repetidos até que se obtivesse quantidade suficiente para realizar os processos fermentativos com concentração celular de 10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup> (Figura 27).

**Figura 27** - Ativação e Crescimento da levedura *P. kudriavzevii*



#### 4.10 Processo Fermentativo

Após a destoxificação dos licores e a concentração dos açúcares até 80 g/L de xilose, o pH foi ajustado com ácido sulfúrico até 3,5 ( $\pm 0,1$ ) e a temperatura ajustada à 37°C ( $\pm 0,1$ ), obtendo-se o mosto.

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL dos mostos inoculado com células de leveduras na concentração de  $10^7$  células.  $\text{mL}^{-1}$ . Os frascos foram mantidos em agitação (125 RPM).

A alimentação com mosto foi realizada em duas etapas, adicionando-se 50 mL de mosto à levedura previamente adaptada a este mosto, completando-se o volume após 40 minutos. Os frascos foram mantidos em mesa agitadora (shaker), com controle da temperatura de  $37^\circ\text{C}$  e controle de rotação sob agitação orbital 125 rpm, por um período de 96 h. Após inoculação, foram realizadas contagens de células de leveduras em Câmara de Neubauer em cada tempo de coleta (0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h) segundo Lee et al. (1981), quantificando-se viabilidade celular das leveduras, viabilidade de brotos e índice de brotamentos (Figura 28).

**Figura 28** - Processo Fermentativo com a quantificação da viabilidade celular



Fonte: Elaboração Própria.

Ao final da fermentação, os vinhos foram centrifugados a  $1650g$ ,  $25^\circ\text{C}$ , por 5 min utilizando uma centrífuga (HIMAC CR 21G).

#### 4.11 Análises Microbiológicas

O processo fermentativo foi finalizado quando após as 96 horas de fermentação. A contagem de células foi efetuada em microscópio óptico comum através de uma adaptação do método de contagem de plaquetas em Câmara de Neubauer já conhecido e também baseado no método desenvolvido por Lee et al. (1981) para a contagem e análise de viabilidade em leveduras utilizando câmara de Neubauer.

Os parâmetros microbiológicos avaliados da levedura em fermentação foram avaliados no início e final do processo realizada através de Câmara de Neubauer (LEE et al. 1981). A Câmara de Neubauer empregada foi a de modelo 1/400 mm<sup>2</sup> x 0,100 espelhada e o método de análise de viabilidade empregado foi o de coloração de Azul de metileno.

Preparou-se tubos de ensaio com 9,9 mL de salina para cada tratamento do experimento conforme as repetições, nos quais as amostras eram inseridas uma a uma, na quantidade de 0,1 mL, agitava-se o tubo e então coletava-se 0,5 mL desta diluição para serem inseridas nos tubos com azul de metileno na proporção de 4,5 mL, deixando por 10 minutos para que se ocorra o processo de coloração nas células mortas.

Depois pegava-se uma amostra e colocava na Câmara de Neubauer, levando ao microscópio, a contagem foi efetuada nos 4 quadriláteros maiores localizados nas laterais da Câmara. A contagem foi efetuada no sentido horário, tomando-se o cuidado de se observar a existência de células localizadas na linha que divide os quadrados menores. O número total de células era a soma do número de células contadas nos 4

quadrados maiores. Para localizar os 4 quadrados maiores utilizou-se o aumento de 10x e para efetuar a contagem utilizou-se o aumento de 40x no microscópio. As células viáveis da amostra eram as pouco ou nada coradas enquanto que as células inviáveis eram as coradas de azul intenso. Com esta contagem fez-se a quantificação:

- viabilidade celular;
- índice de brotamento;
- viabilidade de brotos;

Os dados da viabilidade foram calculados através das seguintes fórmulas:

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

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

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

O vinho delevurado foi obtido a partir da separação da levedura, por centrifugação a 2500g/30°C, durante 5 minutos em centrífuga HIMAC CR 21G.

#### **4.12 Delineamento Experimental (Processo Fermentativo)**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com parcela subdivididas em 3 repetições, sendo o tratamento principal o misturas gradativo de sorgo biomassa e cana-energia (SB:CE), nas proporções de 25:75%; 50:50%; 75:25% respectivamente e de 100 (CE)%, 100%(SB), e o tratamento secundário a destoxificação dos licores pelo método convencional, biofloculante de *M. oleífera* Lam e o licor sem destoxificação, e o tratamento terciário os tempos de fermentação (0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h).

#### **4.13 Produção de Etanol**

No vinho delevurado, foi determinado o teor de glicerol, segundo Copersucar (1988), Teor alcoólico, através de densímetro digital.

#### **4.14 Análise dos resultados**

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo Teste F. de comparação de médias pelo teste de Tukey usando-se o software Experimentação Agronômica ; AgroEstat: Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agronômicos (BARBOSA; MALDONADO JÚNIOR, 2015).

## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização dos Bagaços Cana-Energia e Sorgo biomassa

Para o desenvolvimento deste estudo quantificou-se as biomassas utilizadas para saber a condição que os materiais se encontravam. Essa diferenciação é necessária para determinar sua composição.

Como resultado da fotossíntese o tecido vegetal está constituído principalmente de carboidratos estruturais e não estruturais. Os componentes principais da biomassa incluem à celulose, hemicelulose, lignina, água, cinzas, entre outros compostos. As porcentagens podem variar dependendo das espécies (JENKINS, et al., 2018). Nota-se que as biomassas estudadas não apresentaram grande variação de composição entre si (Tabela 02).

**Tabela 02** – Dados médios da composição química dos bagaços in natura de Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), Cana-energia (50%) + Sorgo biomassa (50%), Cana-energia (25%) + Sorgo biomassa (75%) e Cana-energia (75%) + Sorgo biomassa (25%).

MisturasGenótipos	Extrativos (%)	Cinzas (%)	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Total (%)
<b>C E 100%</b>	2,45	5,04	21,33	40,34	31,31	100,47
<b>SB 100%</b>	2,91	3,45	16,79	44,3	32,17	99,62
<b>CE 50% + SB 50%</b>	2,68	4,25	19,06	42,32	31,74	100,05
<b>CE 25% + SB 75%</b>	2,79	3,84	17,92	43,31	31,95	99,81
<b>CE 75% + SB 25%</b>	2,56	4,64	20,19	41,33	31,52	100,24

No entanto, analisando as cinzas percebe-se maiores teores para os tratamentos com cana-energia na faixa de 4,25 a 5,04%, Manyà e Arauzo (2008), encontraram valores próximos ao presente experimento da ordem de 5,02% em cana

convencional. Diferente de outros autores que estudando bagaço de cana tradicional encontraram valores da ordem de 2,02% a 2,93% (HASSUANI et al.2005; BIZZO, *et al.*, 2014; JENKINS, *et al.*, 2018), no entanto essa caracterização pode variar de acordo com cultura utilizada e tratos culturais.

As cinzas têm em sua composição a sílica e compostos como o óxido de potássio e o cloro, substâncias que são parâmetros determinantes na predição das incrustações nas caldeiras. Segundo Silva (2014), quanto menor for sua porcentagem menor o risco de incrustações nas caldeiras.

As cinzas do bagaço de sorgo biomassa (Tabela 02) apresentaram porcentagens da ordem de 3%, estes valores são inferiores aos encontrados por Freita (2017b) e Batista (2016), com 6,73% e 6,50% respectivamente.

Da comparação do misturasde genótipos de sorgo biomassa e cana-energia pode-se constatar que os valores de celulose (Tabela 02) para o sorgo biomassa foram ligeiramente superiores aos da cana-energia. Freita (2017b), avaliando o mesmo genótipo de sorgo obteve valores próximos ao presente de 37,72%, diferente de Batista (2016) que obteve teores de 22,1%.

A celulose é um polímero formado por longas cadeias de glicose unidas por ligação  $\beta$ 1-4 sendo um substrato perfeito para processos fermentativos (BANERJEE *et al.*, 2016; OGEDA; PETRI, 2010).

A hemicelulose difere da celulose, principalmente, por sua constituição em diferentes unidades de açúcares, formando cadeias moleculares curtas e bastante ramificadas. Os açúcares que formam as estruturas das hemiceluloses incluem pentoses, hexoses, e alguns ácidos. Os resultados para este constituinte das biomassas conforme a tabela 01, pouco variou permanecendo todos os tratamentos

próximos de 31%. Tal resultado corrobora com Batista (2016), em estudos com sorgo biomassa, que também obteve teores da ordem de 30%, diferentemente dos resultados encontrados por Freita (2017b), com teores próximos de 20%.

A estrutura química da lignina é bastante complexa e ainda não é conhecida completamente. A proporção dos precursores da lignina varia entre as diferentes espécies de plantas, fato notório neste estudo para o qual tem-se teores superiores em 21,28% para o genótipo de cana-energia comparado ao sorgo biomassa (Tabela 02).

Para a composição de extrativos (Tabela 02), observou-se que todos os tratamentos se mantiveram próximos. Os extrativos são compostos intermediários do metabolismo do vegetal; proporcionam reserva energética e proteção ao vegetal contra o ataque de microrganismos e insetos, porém, têm efeito inibitório nos processos de conversão de biomassa (FENGEL; WEGENER, 1989).

## **5.2 Determinação dos açúcares no licor hemicelulósico**

A quantificação dos açúcares é de extrema importância para o processo fermentativo de etanol lignocelulósico, a composição destes açúcares evidencia o quanto eficiente foi o pré-tratamento das biomassas. Notou-se que as biomassas em conjunto em maiores quantidades de cana-energia, resultaram nos menores valores de disponibilização de açúcares. Em contrapartida as biomassas com sorgo revelaram um maior teor de açúcar.

A Tabela 3 apresenta os valores de açúcares nos licores obtidos após as condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. Observou-se que a

temperatura e concentração de ácido mais elevadas não foi favorável para as biomassas isoladas ou ainda misturadas.

**Tabela 3** - Resultados da composição média dos licores obtido após o pré-tratamento com ácido diluído em duas condições, com relação a glicose e xilose.

<b>Condições de Pré-Tratamento Hidrólise Ácido-Diluído</b>		
<b>120°C -20 minutos-0,2% (m/v)</b>		
<b>Concentração de açúcares</b>	<b>Glicose</b>	<b>Xilose</b>
	<b>g/L</b>	
C E 100%	0,55	6,66
SB 100%	1,09	12,78
CE 50% + SB 50%	1,04	9,77
CE 25% + SB 75%	1,03	11,69
CE 75% + SB 25%	0,92	8,05
<b>140°C -15 minutos-0,5% (m/v)</b>		
<b>Concentração de açúcares</b>	<b>Glicose</b>	<b>Xilose</b>
	<b>g/L</b>	
C E 100%	ND	5,57
SB 100%	1,07	7,6
CE 50% + SB 50%	0,31	6,21
CE 25% + SB 75%	0,21	8,8
CE 75% + SB 25%	0,10	5,67

\*A sigla ND refere a resultados não detectados.

Os resultados de açúcares demonstraram que o sorgo biomassa tem uma maior concentração de xilose e glicose quando comparado a matéria-prima da cana-energia. Freita (2017b), obteve valores analisando o genótipo de sorgo biomassa para xilose de 13,07 g/L e glicose de aproximadamente 0,8 g/L, este resultado corrobora com o presente estudo. Roviero (2017) analisando bagaço de cana obteve valores próximos a 10,54 g/L para xilose e para a glicose não houve detecção.

Os valores obtidos revelaram a melhor condição de 120°C, no tempo de 20 minutos com a concentração de 0,2% (m/v), e esta foi a utilizada para o licor em todo o experimento.

### 5.3 Destoxificação do Licor

O processo de destoxificação do licor tem como precedente remover compostos indesejáveis como fenóis e ácidos, para o processo fermentativo se tornar mais eficiente. Ao utilizar o bioflocculante de sementes de moringa percebe-se redução destes componentes a níveis satisfatórios e comparado ao método convencional por carvão ativado, percebeu-se uma maior redução.

**Tabela 4** - Valores médios obtidos para Acidez total e Fenol dos licores nos genótipos cana-energia e sorgo biomassa e as misturas.

	<b>Acidez total Total</b>	<b>Compostos Fenólicos</b>
	<b>g.L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>Mg.L<sup>-1</sup></b>
<b>Genótipos</b>		
<b>CE 100%</b>	15,71A	1103,95A
<b>SB 100%</b>	3,94D	971,41D
<b>CE 50% + SB 50%</b>	4,56C	998,05C
<b>CE 25% + SB 75%</b>	5,87C	1091,48B
<b>CE 75% + SB 25%</b>	9,28B	1036,38B
<b>DMS</b>	0,2338	2,6374
<b>CV</b>	2,16	0,2011
<b>F</b>	7806,08**	8978,44**
<b>Tratamentos Licores</b>		
<b>Sem tratamento</b>	23,57A	1134,90A
<b>Destoxificado Convencional</b>	1,76B	1124,92B
<b>Destoxificado com Moringa</b>	0,34C	860,77C
<b>DMS</b>	0,1501	1,5857
<b>CV</b>	2,24	0,1955
<b>F</b>	91438,76**	16687,71**

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste de Tukey 5%). As letras comparam médias na coluna. \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 = p < .05$ ). DMS - Desvio Mínimo Significativo. CV - Coeficiente de Variação.

A tabela 04 apresenta os valores estatísticos dos genótipos de cana-energia e sorgo biomassa e suas misturas, para os compostos inibitórios do licor hemicelulósico

para os quais percebe-se a interação dos mesmos aos quais serão desdobrados e descritos através dos gráficos representados nas figuras 29 e 30.

Nota-se que para os compostos fenólicos e ácidos totais os maiores resultados entre os genótipos foi para a cana-energia (Tabela 04) e as misturas que continham as maiores proporções do mesmo genótipo.

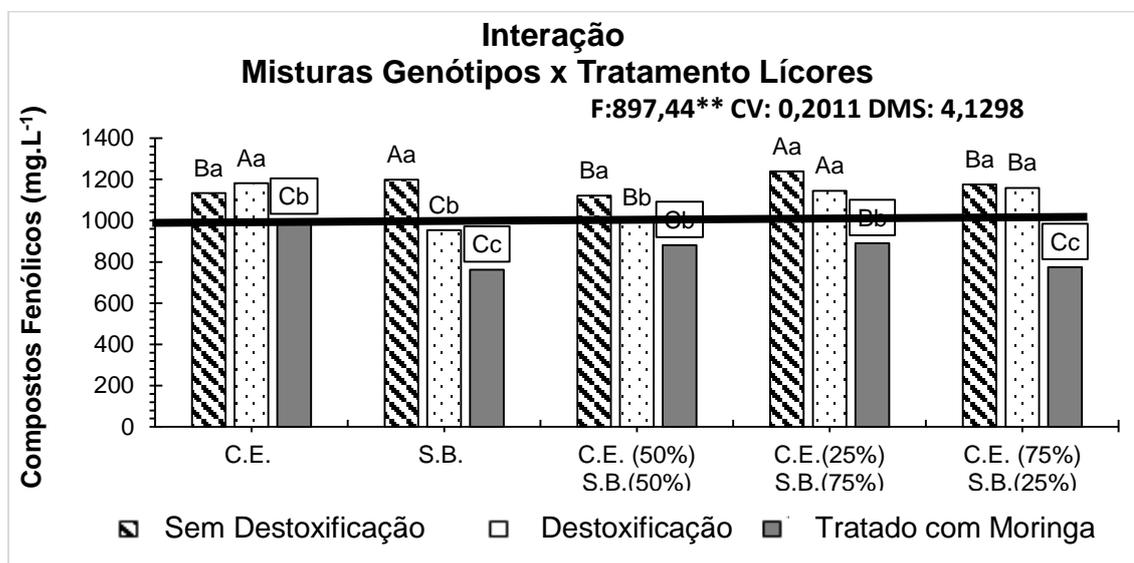
Para a destoxificação os menores teores alcançados foram para os tratados com o método de destoxificação pela moringa.

Os compostos fenólicos podem ser formados a partir da degradação parcial de lignina e afetam as membranas biológicas de leveduras, prejudicando sua integridade e, assim, afetando sua capacidade de reprodução (PALMQVIST; BARBELHAN, 2000).

Para este parâmetro de qualidade do licor percebeu-se a interação entre o misturas de genótipos e os tratamentos de destoxificação estudados (Figura 24), para os quais os maiores teores de compostos fenólicos estão demonstrados para o tratamento que não se fez a destoxificação.

Verificou-se também que o tratado com *M. oleífera* Lam reduziu os teores de compostos fenólicos em todas as misturas estudadas. O sorgo (100%) com *M. oleífera* Lam foi o que apresentou menor valor de compostos fenólicos, com 38,51% de remoção em relação ao licor sem destoxificar. Estudos de Silva-Fernandes *et al*, (2017), utilizando biopolímeros na destoxificação do licor de bagaço de cana encontraram reduções da ordem de 40%, valor similar ao presente estudo.

**Figura 29** – Resultado da Interação de Compostos Fenólicos para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%).



Valores médios observados e resultados da análise de variância e teste de Tukey para a na Interação dos Misturasdos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%) o tratamento dos licores (Sem destoxificação, Destoxificado e Tratado com *M. oleífera* Lam). Letras minúsculas comparam tratamentos dentro de cada genótipo. Letras maiúsculas comparam Genótipos dentro de cada tratamento.

Kelly *et al.* (2008), descreveram que concentrações de 1.000 mg.L<sup>-1</sup> de compostos fenólicos inibiram severamente o crescimento da estirpe *C. guilliermondii* destinada a produção de etanol de segunda geração em meio semi-sintético à base de xilose. Com base nesta informação percebemos que as concentrações de compostos fenólicos no licor destoxificado para o licor de sorgo (100%) e para as misturas CE (50%) + SB (50) eram os únicos neste tratamento que apresentaram-se com teores menores ao citados como prejudiciais ao microrganismo, com valores de 900 mg.L<sup>-1</sup>.

No entanto o tratado com *M. oleífera* Lam tanto para cana-energia, como para o sorgo biomassa e as misturas, demonstraram resultados inferiores a 1.000 mg. L<sup>-1</sup>. Cabe ressaltar que o presente estudo utilizou uma linhagem de *P. kudriavzevii*, no

entanto não há estudos de compostos fenólicos para o processo fermentativo com esta levedura.

Embora o fenol esteja solubilizado no licor, no processo fermentativo esta impureza pode apresentar efeito negativo sobre a microbiota fermentativa, como importantes inibidores do crescimento/desenvolvimento das leveduras na fermentação (PIENKOS; ZHANG, 2015).

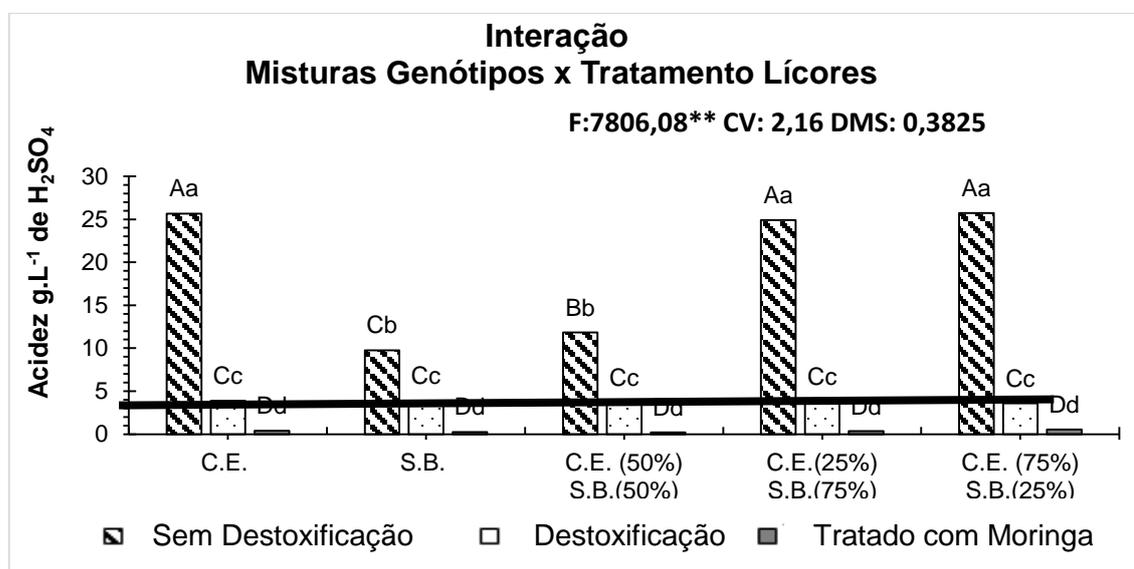
A utilização dos ácidos no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos tem-se mostrado promissora, porém apresenta inconvenientes que são indesejáveis para a indústria, dentre eles temos a formação de compostos inibitórios provenientes da degradação dos açúcares, a corrosão dos reatores, além dos problemas em se tratar os resíduos gerados durante o processo (RODRIGUEZ-CHONG et al., 2004; GÁMEZ et al., 2006).

A determinação dos teores de acidez dos licores estudados indicou que houve a interação entre as misturas dos genótipos e os tratamentos dos licores utilizados (Figura 25).

Os tratamentos sem destoxificação apresentaram uma maior concentração em relação ao demais avaliados, esta condição já era esperada uma vez que se realizou o pré-tratamento ácido nos bagaços para obtenção dos licores.

Contudo observa-se que para a cana-energia (100%), e para as misturas CE (25%) + SB (75%) e CE (75%) + SB (25%) foram os valores foram da ordem de 25 g.L<sup>-1</sup>, estes corroboram os obtidos por Roviero *et al.* (2015), que obteve teores de 25,03 g.L<sup>-1</sup> em bagaço de cana convencional.

**Figura 30** - Resultado da Interação de Acidez Total para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%).



Valores médios observados e resultados da análise de variância e teste de Tukey para a na Interação dos Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%) o tratamento dos licores (Sem destoxificação, Destoxificado e Tratado com *M. oleífera* Lam). Letras minúsculas comparam tratamentos dentro de cada genótipo. Letras maiúsculas comparam Genótipos dentro de cada tratamento.

Os tratamentos com destoxificação convencional dos licores resultaram em reduções próximas para todos os genótipos com seus mix, e estas foram de 85%, este resultado corrobora com Roveiro *et al.* (2015), que com a mesma condição de destoxificação, obteve redução de 80%.

A utilização de *M. oleífera* Lam como adjuvante do tratamento do licor proporcionou a redução de ácidos foi superior a 95% para todos os misturas estudados. Esta redução apresentada é de extrema significância para a produção de etanol de segunda geração, uma vez que a presença de ácidos como constituintes nos licores pode inibir seriamente os microrganismos durante a

fermentação, provocando e diminuindo o rendimento e produtividade do bioprocesso e redução da formação de biomassa.

#### 5.4 Processo Fermentativo – Viabilidade Celular

O bom desempenho do processo fermentativo depende da viabilidade das células e assegurar que as estas estão viáveis é um dos requisitos importantes, e constatou-se que a viabilidade do inóculo da levedura *P. kudriavzevii* LJ03, estava em de 94,36%.

**Tabela 5** - Dados estatísticos das análises de Viabilidade do Processo, Brotamento das Células e Viabilidade dos Brotos.

%	Viabilidade	Brotamento	Viabilidade dos Brotos
<b>Genótipos</b>			
CE 100%	79,19B	13,78B	72,17B
SB 100%	81,07A	16,24A	76,70 <sup>a</sup>
CE 50% + SB 50%	75,93C	14,35B	71,39B
CE 25% + SB 75%	73,64C	12,17C	58,65C
CE 75% + SB 25%	72,73D	7,66D	58,01C
DMS	0,51	0,63	1,57
CV	1,18	8,81	4,14
F	928,14 <sup>**</sup>	491,70 <sup>**</sup>	548,48 <sup>**</sup>
<b>Tratamentos Licores</b>			
Sem Destoxificação	70,66C	6,85C	48,44C
Destoxificação Convencional	74,23B	13,80B	67,81B
Destoxificado Moringa	84,64A	17,87A	85,90 <sup>a</sup>
DMS	0,23	0,17	0,91
CV	0,87	3,93	3,88
F	1371,69 <sup>**</sup>	2712,65 <sup>**</sup>	1249,25 <sup>**</sup>
<b>Tempos</b>			
12 Horas	85,97A	15,67A	75,48 <sup>a</sup>
24 Horas	79,57B	13,05C	69,54B
48 Horas	78,30C	15,43A	68,54B
72 Horas	72,96D	13,92B	67,46C
96 Horas	65,75E	11,44D	55,54D
DMS	0,34	0,35	1,01
CV	0,89	5,56	2,99
F	652,78 <sup>**</sup>	470,22 <sup>**</sup>	779,24 <sup>**</sup>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste de Tukey 5%). As letras comparam médias na coluna. <sup>\*\*</sup> significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ) \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 = p < .05$ ). DMS - Desvio Mínimo Significativo. CV - Coeficiente de Variação.

As análises de viabilidade celular, brotamento das células e viabilidade dos brotos estão apresentadas na tabela 05, para os quais notou-se a interação entre todos os parâmetros estudados e o desdobramento destas interações estão representados nas figuras 31 a 39.

A utilização do extrato de semente de moringa resultou em maiores viabilidades celulares, brotamento e viabilidade dos brotos (tabela 05), conferindo que o processo de destoxificação por este método apresentou melhor condição fermentativa para a levedura *P. kudriavzevii*. Para os genótipos estudados a utilização do sorgo biomassa resultou em maiores índices de células viáveis.

Para os tempos analisados de fermentação ocorreu um decréscimo gradativo ao longo do tempo (Tabela 05), este fato ocorre devido ao esgotamento de açúcares do meio e a falta de condições para a levedura.

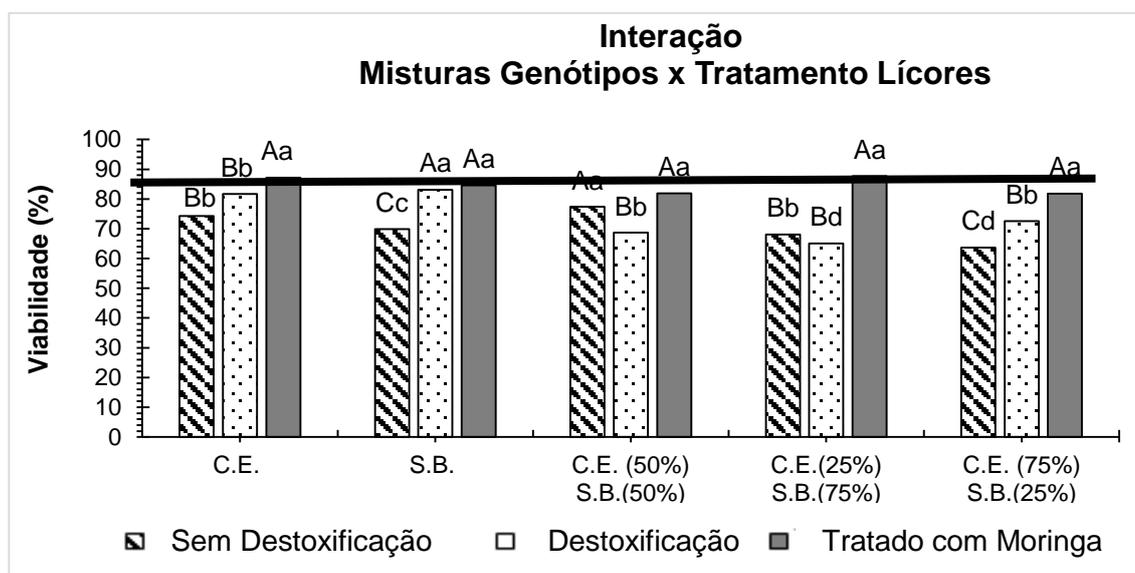
Freita (2017b), obteve com a mesma levedura uma viabilidade inicial de 89%, já Santos (2012) com outra linhagem de *Pichia ssp*, obteve uma viabilidade de 60%. Ceccato Antonini (2012), cita a importância do controle da viabilidade celular, uma vez que a indústria de cana-de-açúcar para produção de álcool combustível, emprega fermentação contínua com reciclo celular, expondo o processo a uma série de situações que facilitam a contaminação por microrganismos indesejáveis.

Para a viabilidade celular do processo fermentativo (Figura 31) verificou-se a interação das misturas dos genótipos com o tratamento dos licores, para o qual obteve-se viabilidades superiores a 80% para os tratamentos em que se utilizou *M. oleífera* Lam em todas as misturas estudadas.

Para o licor com destoxificação convencional as misturas de CE (50%) + SB (50%) e CE (25%) + SB (75%), foram os que demonstraram uma viabilidade menor

em torno de 65%, este resultado é similar ao de Roviero *et al.* (2015), que obteve com hidrolisado de cana destoxificado, teores de 69,50%.

**Figura 31** – Resultado da Interação de Viabilidade Celular para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%).



Valores médios observados e resultados da análise de variância e teste de Tukey para a Viabilidade Celular do processo fermentativo na Interação das Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%) com o tratamento dos licores (Sem destoxificação, Destoxificado e Tratado com *M. oleífera* Lam). Letras minúsculas comparam tratamentos dentro de cada genótipo. Letras maiúsculas comparam Genótipos dentro de cada tratamento.

Quando se avalia o licor sem destoxificação verificou que os microrganismos apresentaram inibição, das leveduras resultando em viabilidades para todos os tratamentos próximos de 60%. Este fato está associado a condição deste licor com sua maior concentração de compostos fenólicos (Figura 29) e acidez total (figura 30).

De acordo com Ravaneli et al. (2011) a presença de biomoléculas inibidoras do processo fermentativo, tais como ácidos e fenóis, além de contaminantes pode provocar a queda na viabilidade das células ao longo dos ciclos fermentativos em função do estresse acumulado pela levedura.

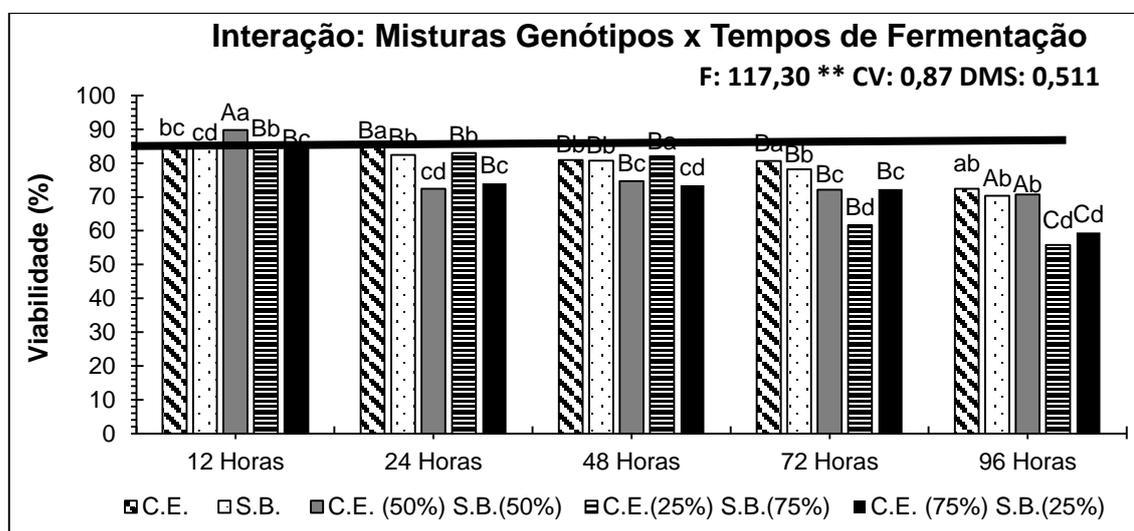
Ceccato-Antoninni et al. (2017), cita que células viáveis são primordiais para uma boa condução do processo fermentativo, além do que garantem novos ciclos fermentativos.

Estudando os tempos de fermentação (Figura 32), observou-se que a viabilidade celular caiu gradativamente para todos as misturas dos genótipos. No entanto percebeu-se que o tratamento com CE (25%) + SB (75%) e o CE (75%) + SB (25%) demonstraram as maiores quedas de viabilidade ao final das 96 horas com 34,93% e 29,36% respectivamente.

Os demais tratamentos ao final das 96 horas estavam com viabilidade superior a 70%, este resultado é próximo ao de Freita (2017b) que obteve após 24 horas viabilidade próximas a 75%. Roviero *et al.* (2015), obteve valores inferiores a este próximo a 60%.

Ventura (2015), cita que o consumo excessivo da energia de manutenção pode levar a perdas em crescimento celular e outras atividades metabólicas essenciais. Em situação de estresse ácido prolongado, a célula perde a capacidade de manter seu pH interno e suas atividades fisiológicas, e isto leva à inibição do crescimento e finalmente à morte celular.

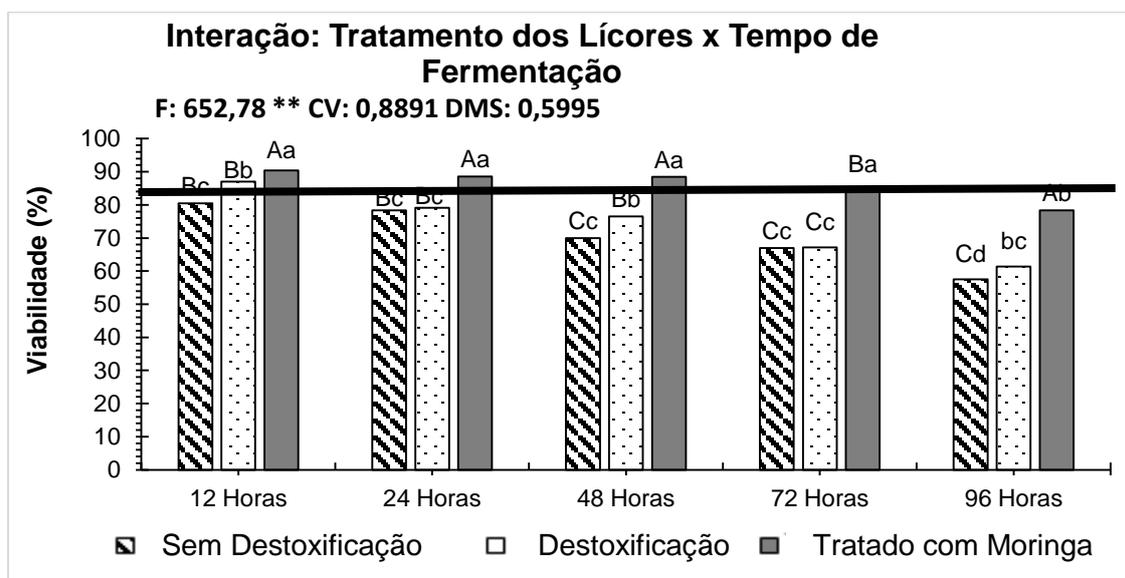
**Figura 32** – Resultado da Interação de Viabilidade Celular para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%).



Valores médios observados e resultados da análise de variância e teste de Tukey para a Viabilidade Celular do processo fermentativo na Interação das Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) SB (75%), CE (75%) + SB (25%) e tempos de fermentação (12, 24, 48, 72 e 96 horas). Letras minúsculas comparam tempos de fermentação dentro de cada genótipo. Letras maiúsculas comparam Genótipos dentro do tempo.

A interação entre os tratamentos dos licores e os tempos de fermentação (Figura 33), evidenciaram que o tratamento sem destoxificação causou a queda 32% da viabilidade celular após as 96 horas, este resultado enfatiza a necessidade da remoção de compostos indesejáveis ao processo, e caracteriza como prejudicial a levedura *P. kudriavzevii*, a presença de teores elevados de compostos fenólicos e ácidos no processo fermentativo.

**Figura 33** - Resultado da Interação de Viabilidade Celular para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%).



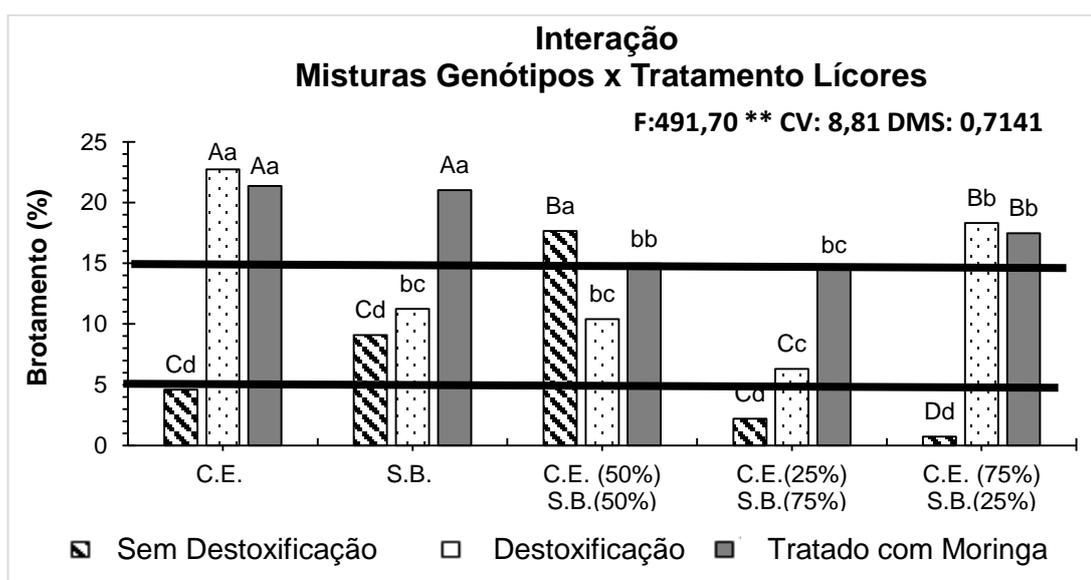
Valores médios observados e resultados da análise de variância e teste de Tukey para a Viabilidade Celular do processo fermentativo na Interação das Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) SB (75%), CE (75%) + SB (25%) e tempos de fermentação (12, 24, 48, 72 e 96 horas). Letras minúsculas comparam tempos de fermentação dentro de cada genótipo. Letras maiúsculas comparam Genótipos dentro do tempo.

Observa-se também que o tratamento com *M. oleífera* Lam apresentou resultados dentro do sugerido, com células de leveduras viáveis. Os resultados obtidos indicaram valores de viabilidade de 85% para uma boa condução fermentativa, até as 72 horas de fermentação, terminando as 96 horas com 78% de viabilidade.

Segundo Milessi *et al* (2013), as fermentações a partir de materiais lignocelulósicos como bagaço de cana, requerem tempo estimado de maior conversão de açúcar em até 96 horas.

Para o brotamento das células (Figura 34) a porcentagem ideal de brotamentos em um processo fermentativo deve se estabelecer-se no mínimo entre 5 a 15%. Os licores tratados com *M. oleífera* Lam estavam todos acima de 14%, os destoxificados convencionalmente também estavam na faixa de 6% a 17%, este fato é importante uma vez que possibilita o melhor desenvolvimento e manutenção da fisiologia da levedura em substrato.

**Figura 34** – Resultado da Interação do Brotamento para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%).



Valores médios observados e resultados da análise de variância e teste de Tukey para a na Interação das Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%) o tratamento dos licores (Sem destoxificação, Destoxificado e Tratado com *M. oleífera* Lam). Letras minúsculas comparam tratamentos dentro de cada genótipo. Letras maiúsculas comparam Genótipos dentro de cada tratamento.

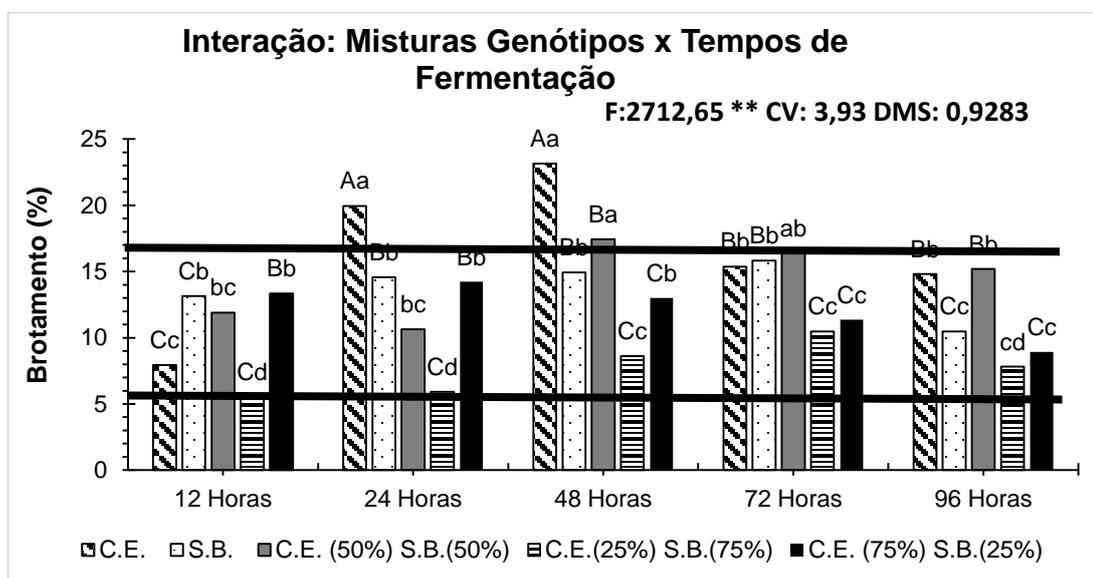
Entretanto os não destoxificados não alcançaram este índice, exceto para o sorgo biomassa (100%) e CE (50%) + SB (50%). Roviero *et al.* (2015), também obteve

teores de 3,13% de brotamento em licores hidrolisados tratados pelo método convencional de destoxificação.

Relatos de FUGITA (2010) asseguram que as leveduras utilizadas em seu estudo apresentaram um desempenho inferior em mostos preparados a partir de licor hemicelulósico, chegando a um o brotamento 4,4%, estes valores médios indicam que os compostos contidos no hidrolisado prejudicaram a brotação de novas células durante a fermentação.

O maior índice de brotamento (Figura 35) foi determinado quando se avaliou a cana-energia (100%) nas primeiras 24 e 48 horas do processo.

**Figura 35** - Resultado da Interação do Brotamento para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%).



Valores médios observados e resultados da análise de variância e teste de Tukey para o brotamento na Interação das Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) SB (75%), CE (75%) + SB (25%) e tempos de fermentação (12, 24, 48, 72 e 96 horas). Letras minúsculas comparam tempos de fermentação dentro de cada genótipo. Letras maiúsculas comparam Genótipos dentro do tempo.

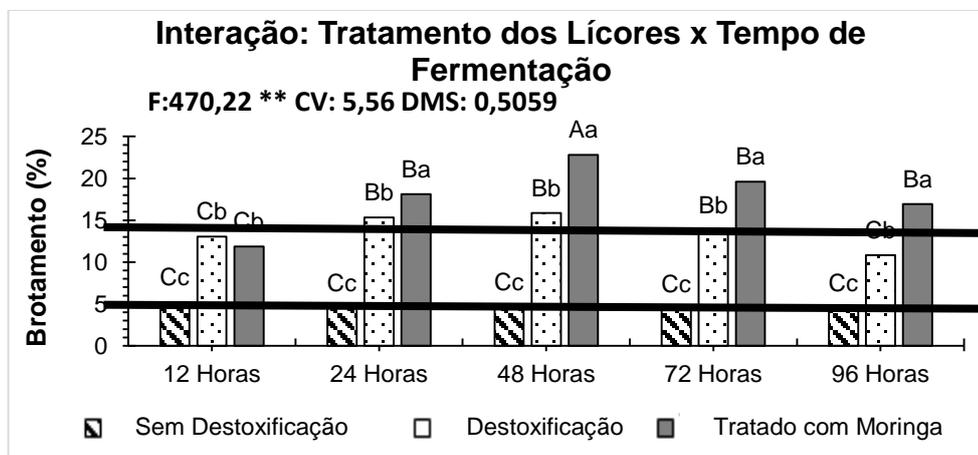
Verifica-se que pode ter ocorrido a redução da concentração dos açúcares graças ao desenvolvimento das células devido condições de baixa concentração de açúcares favorecido o processo de respiração, e a multiplicação de células em taxas mais elevadas. (WALKER, 2008).

Da análise do tratamento dos licores com os tempos de fermentação (Figura 36), verifica-se que as misturas dos tratamentos dos licores com *M. oleífera* Lam e os destoxificado convencionalmente, estavam superiores a 10% em todo período da fermentação.

Para o tratamento em que não destoxificou o licor, verificou-se que apenas nas primeiras 12 horas de brotamento o índice foi de 5%, e que as horas subsequentes foram abaixo deste valor. A não destoxificação do licor antecedendo ao processo de fermentação é negativa e pode provocar redução de valores abaixo de 5% após 12 horas de fermentação conforme demonstra a figura 36.

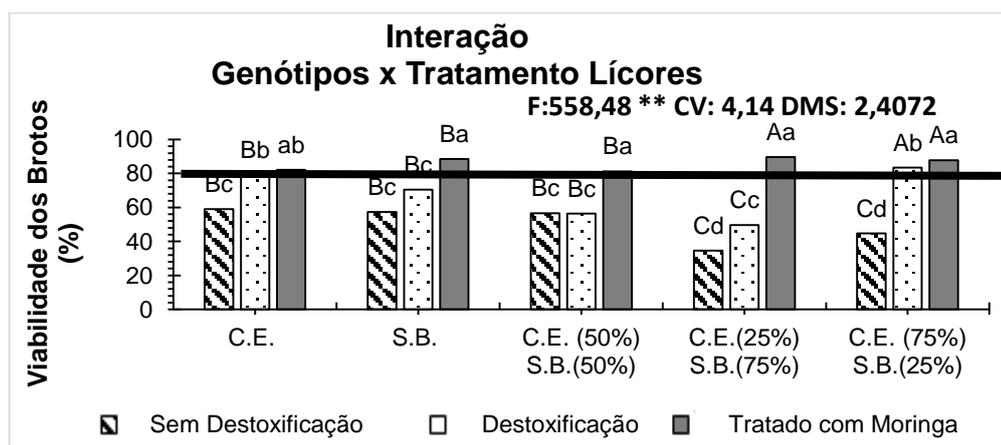
Amorin (2006), cita a importância de os brotos serem viáveis para uma melhor condução fermentativa, ocasionando eficiência para a indústria que irá se utilizar dos microrganismos em um novo ciclo. A viabilidade dos brotos (Figura 32) apresentou-se acima de 80% para as misturas tratadas com *M. oleífera* Lam, para o licor destoxificado apresentou viabilidade de brotos acima de 70% exceto para as misturas CE (50%) + SB (50%) e CE (25%) + SB (75%), no entanto este resultado corrobora com a viabilidade celular (figura 36), com o mesmo comportamento.

**Figura 36** - Resultado da Interação do Brotamento para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%).



V alores médios observados e resultados da análise de variância e teste de Tukey para o brotamento na Interação das Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) SB (75%), CE (75%) + SB (25%) e tempos de fermentação (12, 24, 48, 72 e 96 horas). Letras minúsculas comparam tempos de fermentação dentro de cada genótipo. Letras maiúsculas comparam Genótipos dentro do tempo.

**Figura 37** - Resultado da Interação da Viabilidade dos Brotos para os Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%).

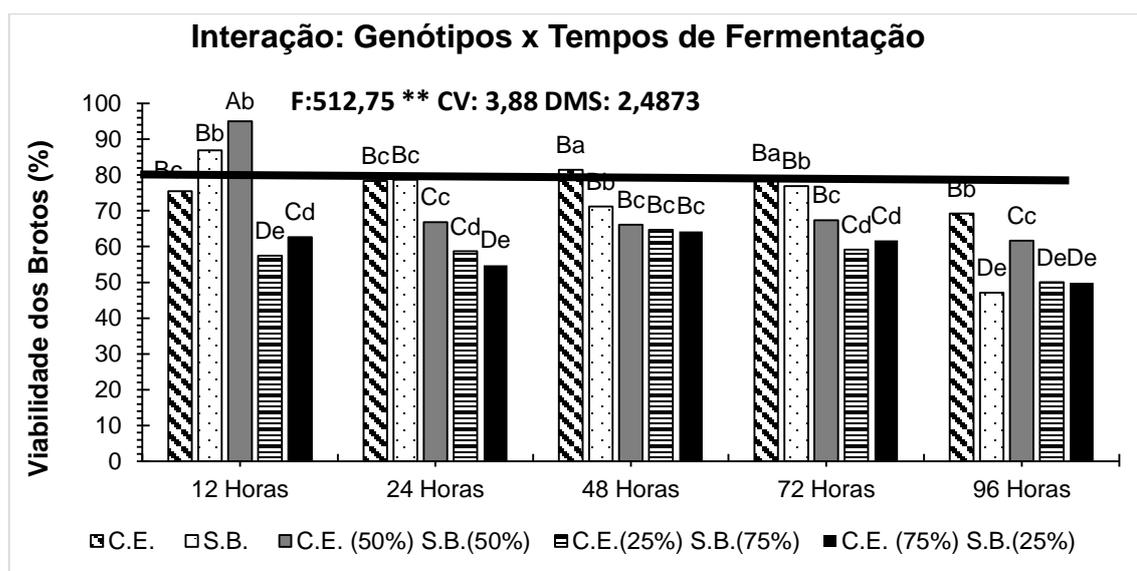


Valores médios observados e resultados da análise de variância e teste de Tukey para a na Interação das Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%) o tratamento dos lícores (Sem destoxificação, Destoxificado e Tratado com *M. oleifera* Lam). Letras minúsculas comparam tratamentos dentro de cada genótipo. Letras maiúsculas comparam Genótipos dentro de cada tratamento.

Quando não se detoxificou o licor os brotos de leveduras foram fortemente influenciados pelos inibidores contidos no processo, obtendo valores inferiores em 50% aos demais tratados, tornando a sua reutilização em outros ciclos comprometida.

Os tempos de fermentação nas misturas dos genótipos (Figura 38) para a Cana-energia (100%) e o Sorgo biomassa (100%), manteve os brotos viáveis acima de 75% até as 72 horas. Para os demais nas mesmas 72 horas a viabilidade dos brotos estava próxima de 60%.

**Figura 38** - Resultado da Interação da Viabilidade dos Brotos para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%).



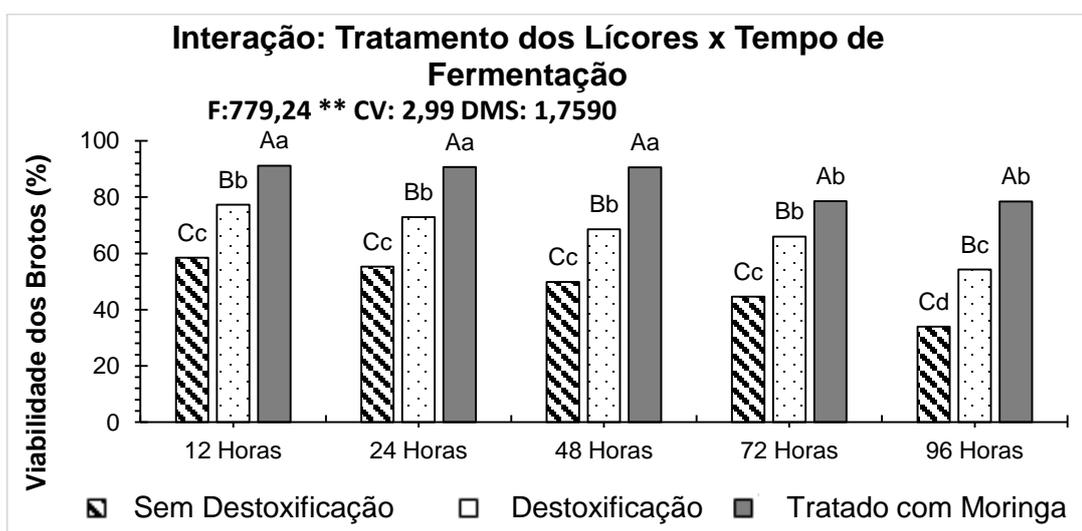
Valores médios observados e resultados da análise de variância e teste de Tukey para o brotamento na Interação das Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) SB (75%), CE (75%) + SB (25%) e tempos de fermentação (12, 24, 48, 72 e 96 horas). Letras minúsculas comparam tempos de fermentação dentro de cada genótipo. Letras maiúsculas comparam Genótipos dentro do tempo.

O tratamento em que se utilizou CE (25%) + SB (75%), foi o que apresentou menor viabilidade durante o decorrer de todo tempo fermentativo.

Após as 96 horas e fermentação as misturas estavam próximas de 60%, exceto a cana-energia que apresentou viabilidade dos brotos de 70%.

Para a realização de todo e qualquer processo fermentativo é de extrema importância que os brotos de leveduras se encontrem viáveis para obtenção do produto de interesse. Por este motivo, é essencial que o fermento a ser utilizado seja analisado para quantificação do número de células e brotos vivos (RIBEIRO, *et al.*, 2019). A análise da figura 39 indica que para o tratamento com o licor de *M. oleífera* Lam, até as 48 horas teve viabilidades dos brotos próximas de 90%, terminando as 96 horas com 80%. Revelando-se um tratamento satisfatório para o desempenho da levedura *P. kudriavzevii*.

**Figura 39** - Resultado da Interação da Viabilidade dos Brotos para as Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%).



Valores médios observados e resultados da análise de variância e teste de Tukey para o brotamento na Interação das Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) SB (75%), CE (75%) + SB (25%) e tempos de fermentação (12, 24, 48, 72 e 96 horas). Letras minúsculas comparam tempos de fermentação dentro de cada genótipo. Letras maiúsculas comparam Genótipos dentro do tempo.

O tratamento em que se utilizou o licor destoxificado convencionalmente apresentou resultados com os brotos viáveis até as primeiras 48 horas decaindo ao longo do tempo de fermentação sendo que ao final do processo os valores foram de 54%. Para o tratamento em que não destoxificou a viabilidade dos brotos foi afetada desde as primeiras 12 horas, corroborando com os resultados obtidos anteriormente para a viabilidade celular (Figura 33) e o índice de brotamento (Figura 36) nos tempos de fermentação.

A viabilidade dos brotos foi superior para o tratado com *M. oleífera* Lam em 62,75% comparado ao não destoxificado, e de 40,50% em relação ao destoxificado convencionalmente.

## **5.5 Produção de Etanol**

A produção de etanol demonstrou uma condição de maior obtenção deste produto para os destoxificado com moringa, principalmente quando inserido da utilização do genótipo de sorgo biomassa, este fato é comprobatório de que a utilização desta metodologia foi eficiente na produção de etanol de segunda geração.

Os efeitos dos inibidores dos processos fermentativos podem ser observados durante e após o processo fermentativo, uma vez que os produtos finais obtidos na fermentação estão diretamente relacionados aos componentes do licor.

A tabela 6 mostra o resultado da estatística do glicerol e teor alcoólico, notou-se que para os genótipos estudados não se observou diferença significativa.

**Tabela 6** - Dados estatísticos para os componentes de glicerol e teor alcoólico, para os tratamentos em que se utilizou as matérias-primas isoladas e misturadas e diferentes métodos de destoxificação.

	<b>Glicerol</b>	<b>Teor Alcoólico</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>
<b>Genótipos</b>		
<b>CE 100%</b>	0,29A	1,84B
<b>SB 100%</b>	0,29A	2,09 <sup>a</sup>
<b>CE 50% + SB 50%</b>	0,29A	1,79B
<b>CE 25% + SB 75%</b>	0,29A	1,69C
<b>CE 75% + SB 25%</b>	0,31A	1,46C
<b>DMS</b>	0,09	0,11
<b>CV</b>	2,56	5,15
<b>F</b>	1,34ns	103,65**
<b>Tratamentos Licores</b>		
<b>Sem tratamento</b>	0,35A	0,25C
<b>Destoxificado Convencional</b>	0,27B	1,96B
<b>Destoxificado com Moringa</b>	0,26C	3,96 <sup>a</sup>
<b>DMS</b>	0,1501	0,07
<b>CV</b>	2,46	5,54
<b>F</b>	997,89**	166,38**

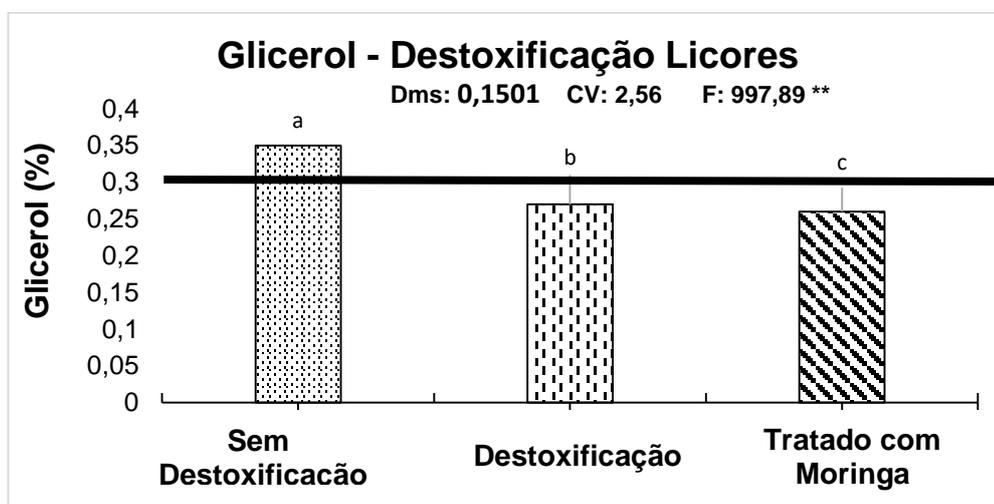
Durante a ocorrência das reações relacionadas ao processo fermentativo são formados diversos subprodutos, tais como glicerol, ácidos, álcoois superiores, ácidos graxos, ésteres, dentre outros, sendo o glicerol produzido em maior quantidade. Sua produção é proporcional à de produção do etanol relacionando-se ao emprego de cofatores importantes para o equilíbrio das reações. A formação do glicerol depende do tipo de levedura utilizada, da pressão osmótica do meio de cultura, da formação de ácidos orgânicos (succínico e acético) e do crescimento da levedura (LEHNINGER et al., 2015, MUTTON et al, 2019).

No processo fermentativo estudando as diferentes misturas dos genótipos contemplados na presente pesquisa (tabela 06) observou-se que os maiores teores de glicerol foram para a Cana-energia (100%), apesar de não diferirem entre si.

Mutton *et al* (2019), avaliando diversas condições de operações de processos fermentativos a partir da produção de etanol de primeira geração, relataram que quanto maior a concentração de inibidores do processo, maior foi a produção de glicerol. Estes autores informam que o glicerol pode corresponder a 0,3% a 0,5%, do vinho obtido indicando que os resultados do presente estudo se encontram dentro desta faixa.

Considerando-se os processos de destoxificação (Figura 40) observa-se que o tratado com *M. oleífera* Lam foi o que obteve o menor teor de glicerol, sendo 25% menor do que o sem destoxificação.

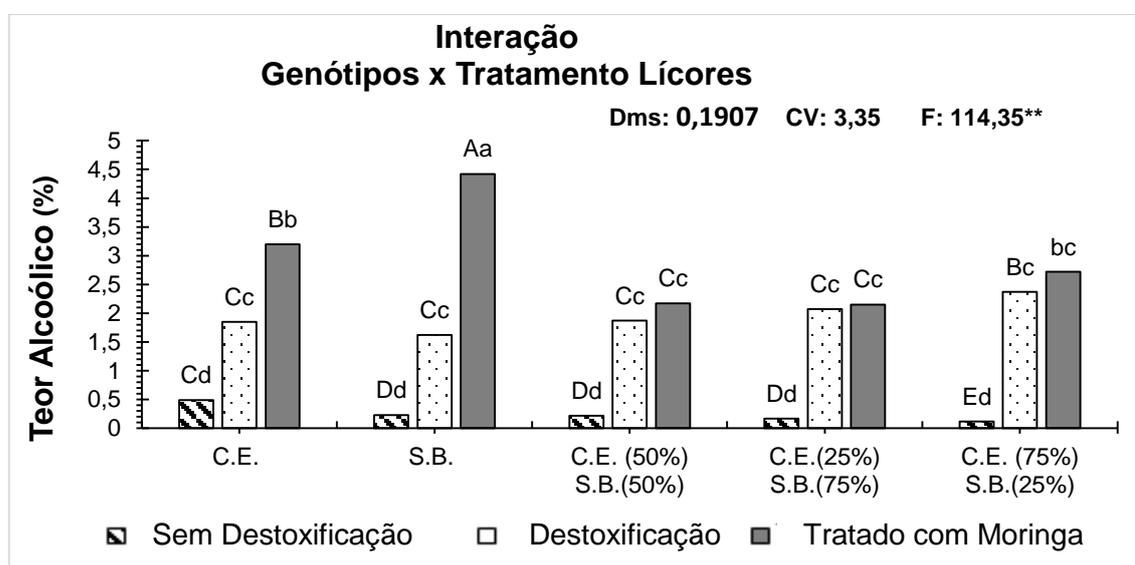
**Figura 40** Valores médios observados e resultados da análise de variância e teste de Tukey para o Glicerol do processo fermentativo dos Tratamento dos licores (sem destoxificação, destoxificado e tratado com *M. oleífera* LAM).



O teor alcoólico determinado para os tratamentos estudados e tratamento dos licores na destoxificação (Figura 41) foi maior para a Cana-energia (100%) e para o Sorgo biomassa (100%) no tratado com *M. oleífera* Lam. Para tratamento com

destoxificação do licor verificou-se valores similares para todos os tratamentos próximos a 2%.

**Figura 41** - Valores médios observados e resultados da análise de variância e teste de Tukey para O teor alcoólico na Interação das Misturas dos Genótipos (Cana-energia (100%), Sorgo biomassa (100%), CE (50%) + SB (50%), CE (25%) + SB (75%), CE (75%) + SB (25%) com o tratamento dos licores (Sem destoxificação, Destoxificado e Tratado com *M. oleífera* LAM).



O licor não destoxificado possibilitou obter resultados mínimos de teor alcoólico, confirmando que a não utilização de qualquer forma de tratamento influencia diretamente na produção de etanol.

O tratamento realizado ao qual se empregou *M. oleífera* Lam com as misturas de sorgo biomassa, em relação ao tratamento de destoxificação convencional e o tratamento que não se detoxificou, apresentou valores de teor alcoólico superior em 94,79% e 63,34%, respectivamente.

A utilização da cana-energia e o tratamento com *M. oleífera* Lam no teor alcoólico resultou 84,67% superior em relação ao não destoxificado e 42% ao destoxificado.

O desempenho fermentativo para o etanol de segunda geração ao longo das horas, que segundo dados da CNPEM (2015), o processo pode chegar a 96 horas para conversão total de C5 em etanol (%), visa ocasionar uma melhor eficiência fermentativa. Todo e qualquer processo industrial tem como objetivo a eficiência de processos, desta forma há melhor aproveitamento de todos os recursos utilizados até a obtenção do produto final.

## 5.6 Nutrientes

Na produção de etanol a disponibilidade de nutrientes é de extrema relevância. Há inúmeras informações sobre exigências de macro e micronutrientes do mosto a ser fermentado por leveduras, no procedimento de primeira geração. Porém, estas investigações para o etanol de segunda geração são escassas.

No presente estudo avaliou-se os teores de nutrientes nos bagaços de sorgo e cana-energia *in natura* e no licor proveniente do pré-tratamento.

Na Tabela 07, quantificou-se o teor de nitrogênio no genótipo do sorgo biomassa, no bagaço *in natura* e no licor, observando-se que após a etapa de pré-tratamento tem-se uma redução de aproximadamente 81% do teor deste nutriente. Acredita-se que este resultado é decorrente da ação do ácido adicionado na fase de pré-tratamento, que ao abrir as células da biomassa acaba gerando esta perda nutricional. Freita (2017b), estudando genótipos de sorgo avaliou, nas mesmas condições de pré-tratamento, reduções similares ao presente estudo, na ordem de 80%.

**Tabela 07** - Quantificação dos teores de nutrientes nas matérias-primas sorgo biomassa e cana-energia, nas condições de bagaço in natura e no licor hemicelulósico.

<b>Concentração de Nutrientes</b>		
<b>120°C -20 minutos-0,2% (m/v)</b>		
<b>Sorgo biomassa</b>	<b>Bagaço in Natura</b>	<b>Licor Hemicelulósico</b>
	<b>g/Kg</b>	
Nitrogênio	4,4	0,8
Manganês	73,3	0,1
Fósforo	3,1	2,3
Magnésio	0,9	0,5
Cálcio	2,0	0,8
Zinco	16,0	ND

<b>Cana-energia</b>	<b>Bagaço in Natura</b>	<b>Licor Hemicelulósico</b>
	<b>g/Kg</b>	
Nitrogênio	3,1	0,4
Manganês	28,7	ND
Fósforo	0,5	ND
Magnésio	0,6	0,4
Cálcio	1,8	0,4
Zinco	0,9	ND

No entanto apesar de ocorrer este decréscimo, percebeu-se que na análise da viabilidade celular a levedura manteve-se próxima a 80% quando se realizou o tratamento do licor (Figura 26).

O nitrogênio é um elemento essencial não apenas para o crescimento como para uma fermentação adequada. Em quantidade insuficiente pode aumentar o tempo de fermentação e reduzir o rendimento, se for acima da quantidade ideal, a levedura irá se multiplicar, desviando o açúcar para a produção de biomassa (STUPIELLO; HORII, 1981).

Ao analisar o teor de manganês ocorreu a redução quase total deste nutriente (Tabela 07) após a etapa de pré-tratamento, sendo demonstrado no licor a ser

fermentado. Não há relatos na literatura para este nutriente no genótipo de sorgo biomassa, submetido a produção de etanol de segunda geração.

Quando se realiza a produção de etanol de primeira geração os relatos para o nutriente fósforo, é que este requer aproximadamente 300ppm (0,3g/Kg) para atingir sua função em todo o processo metabólico, principalmente na síntese, translocação e acúmulo de açúcares. Deve-se considerar ainda que teores de fósforo são essenciais para o bom desenvolvimento dos processos industriais tais como a clarificação dos caldos. Percebe-se que apesar da redução de 25,80% deste elemento nutricional (Tabela 07), no licor celulósico, ainda estava dentro do necessário.

O Magnésio desempenha um papel importante para o metabolismo das leveduras atuando como co-fator de diversas reações metabólicas, tais como a produção de citrato na via glicolítica e a exportação de acetato para o exterior da célula. O teor ideal para o bom desenvolvimento do processo é de 0,2 g/kg (AMORIM et al. 1985; ANDRIETTA et al. 2004). Os Resultados obtidos para o magnésio (Tabela 07), para o sorgo biomassa estavam dentro desta faixa, mesmo após o pré-tratamento do bagaço.

Na tabela 07, percebe-se o mesmo comportamento dos nutrientes avaliados anteriormente com redução em relação a biomassa *in natura*, esta diminuição foi de aproximadamente 60%.

Ao avaliar o nutriente zinco (Tabela 07), notou-se que este foi eliminado no licor pré-tratado. Freita (2017b), avaliando outros genótipos de sorgo obteve reduções de 85%.

Para desenvolvimento do processo fermentativo deve-se conter substâncias que atendam às suas necessidades nutricionais, fornecendo-lhes: C, H, N, O, P, K, S,

Mg, Fe, Zn, vitaminas e outros. Assim, as presenças destes nutrientes em quantidades adequadas e balanceadas interferem no desempenho e viabilidade das leveduras, e resultam em excelente rendimento fermentativo. Como no caso do zinco houve a redução por completo ressalta-se neste estudo que se realize a suplementação do mesmo, para melhorar a eficiência fermentativa.

Analisando o genótipo de cana-energia para todos os nutrientes estudados (Tabela 07), percebeu-se redução. Também se nota que os teores nutricionais encontrados no material in natura, são menores em relação ao genótipo de sorgo biomassa. Fato este que pode ter sido determinante para a redução intensa ou por completa dos elementos no licor pré-tratado.

## 6.0 CONCLUSÕES

A utilização da nova metodologia de destoxificação do licor hemicelulósico pelo emprego do biofloculante de semente de *M. oleífera* Lam comparado ao método convencional (carvão ativado) apresentou maior eficiência para remoção de compostos fenólicos e ácidos totais.

O processo fermentativo utilizando a estirpe de levedura *P. kudriavzevii* LJ3 com a destoxificação do licor através do método do biofloculante de moringa manteve a viabilidade celular, brotamento e viabilidade dos brotos, com porcentagens satisfatórias para uma melhor obtenção de etanol de segunda geração, permitindo o reaproveitamento das células para outros ciclos fermentativos.

Para os tratamentos estudados de genótipos, o sorgo biomassa isolado e a cana-energia responderam positivamente para o tratamento com *M. oleífera* Lam, resultando em maiores teores alcoólicos.

### Agradecimento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR 16550:2016 Emenda 1:2018 Disponível em:

<https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=362093>. Acesso em 29/01/2020.

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

ALFENORE, S.; CAMELEYRE, X.; BENBADIS, L.; BIDEAUX, C.; URIBELARREA, J. L.; GOMA, G.; MOLINA-JOUVE, C.; GUILLOUET, S. E. Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 63, p. 537-542, 2016.

ALONSO, D. M.; WETTSTEIN, G.; DUMESIC, J. A. BIMETALLIC Catalysts for Upgrading of Biomass to Fuels and Chemicals. *Chem Soc Rev.* 2012, 41, 8075-8098.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

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

AMORE, A.; CIESIELSKI, P. N.; LIN, C. Y.; SALVACHÚA, D.; NOGUÉ, V. S. Development of lignocellulosic biorefinery technologies: recent advances and current challenges. *Australian Journal of Chemistry*, v. 69, p. 1201-1218, 2016.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C; ALVES, D. M.G. Processo de Produção de Álcool controle e monitoramento. FERMENTEC/FEALQIESALQ-USP. Piracicaba,1985.

AMORIM, H. V. Fermentação alcoólica: ciência ; tecnologia. Fermentec: Piracicaba, 448 p, 2006.

ANDRIETTA, S.R.; MIGLIARI, P.C.; ANDRIETTA, M.G.S. Classificação das cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. *Stab: Açúcar, Álcool e Subprodutos*, Piracicaba, v.17, nº5, p.54-59, 2004.

ANP – Agência Nacional de Petróleo. Definições de Biocombustíveis. 2018. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis>. Acesso em 18 março de 2020.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for biofuels*, 3(1), 1.

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

AWAD, M.; WANG, H.; LI, F. Preliminary study on combined use of *M. oleífera* LAM seeds extract and PAC for water treatment. *Research Journal of Recent Sciences*, 2 (8), 52-55, 2013.

BANERJEE, D. KHANDELWAL, N.K.; SANGLARD, N.; PRASAD, R. Enhanced saccharification efficiency of lignocellulosic biomass of mustard stalk and straw by salt pretreatment. *Industrial Crops and Products*, v. 80, p. 42–49, 2016.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JÚNIOR, W. Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos - AgroEstat, versão 1.1, 2015.

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

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

BIOFUTURE PLATAFORM, 2017. Disponível em: <http://www.itamaraty.gov.br/pt-BR/notas-a-imprensa/17880-anuncio-da-declaracao-de-visao-da-plataforma-para-o-biofuturo-plataforma-para-o-biofuturo-bonn-16-de-novembro-de-2017>. Acesso em 24 de março de 2020.

BIZZO, W. A. Tecnologias da biomassa para conversão de energia. In: DIVERSIFICAÇÃO energética: uma estratégia de desenvolvimento para o Rio Grande do Norte. Natal: UFRN, 2007.

BRIENZO, M., ABUD, Y., FERREIRA, S., CORRALES, R. C., FERREIRALEITÃO, V. S., DE SOUZA, W., ; SANT'ANNA, C. (2016). Characterization of anatomy, lignin distribution, and response to pretreatments of sugarcane culm node and internode. *Industrial Crops and Products*, 84, 305-313.

CADETE, R.M.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; SOLENZAL, A.I.N. Eucalyptus hydrolysate detoxification with actived charcoal adsorption or ion-exchange resins for xylitol production. *Process Biochemistry*, v.39, p.1909-1912, 2009.

CADETE, R. M.; MELO, M. A.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J.; MOURO, A.; PROMPT, A. H.; GOMES, F. C.; STAMBUK, B. U.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel (D)-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, Dordrecht, v. 103, n. 2, p. 421-431, 2013.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of

hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, 15 p., 2012.

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

CARRILLO, M.A.; CARRILLO, S.A.; STAGGENBORG J.A.; PINEDA, J. Washing sorghum biomass with water to improve its quality for combustion. *Fuel*, London, v.116, p. 427-431, 2014.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; CODATO, C.B.; MARTINI, C.; BASTOS, R.G; TAUKTORNISIELO, S.M. Yeast for pentose fermentation: isolation, screening, performance, manipulation, and prospects. CHAPTER 08 In: Buckeridge, M.S.; De Souza, A.P. (Eds.) *Advances of Basic Science for Second Generation Bioethanol from Sugarcane*. Springer, p.133157. 2017.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; *Microbiologia da fermentação alcoólica A importância do monitoramento microbiológico em destilarias*. São Carlos : EdUFSCar, 2012. 105 p. - (Coleção UAB-UFSCar). 2012.

CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). *Agenda Positiva da Mudança do Clima e do Desenvolvimento Sustentável. Relatório prospecção etanol*

de segunda geração - E2G 2030. Panorama analítico prospectivo dos biocombustíveis e bioprodutos. Brasília, DF Dezembro, 2018.

CHANDRA, R. P., ARANTES, V., ; SADDLER, J. Steam pretreatment of agricultural residues facilitates hemicellulose recovery while enhancing enzyme accessibility to cellulose. *Bioresource technology*, 185, 302-307. 2015.

CHANDRA, R. P., ESTEGHLALIAN, A. R., ; SADDLER, J. N.. Assessing substrate accessibility to enzymatic hydrolysis by cellulases. *Characterization of lignocellulosic materials*, 60-80, 2008.

CHEMMÉS, C. S.; SILVA, F. C.; SOUZA, L. S.; JUNIOR, R. A. A.; CAMPOS, L. M. A. Estudo de métodos físico-químicos no pré-tratamento de resíduos lignocelulóticos para produção de etanol de segunda geração. Salvador, 2013.

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

CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em energia e Materiais. Disponível em: <http://pages.cnpem.br/tecnologia-etanol/wp-/uploads/sites/66/2015/12/tassia-junqueira.pdf>. 2015.

COPERSUCAR. Proálcool: Fundamentos e Perspectivas. 2ed.São Paulo, 121 pgs, 1988.

COSTA, G. H. G.; Emprego do extrato de moringa (*Moringa oleífera* Lamarck) na clarificação do caldo de cana para produção de açúcar e etanol. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veteriárias – Unesp Jaboticabal, 2015.

CTC. Manual de métodos de análises para açúcar. Piracicaba, Centro de Tecnologia Canaveira, Laboratório de análises, Disponível em CD ROM. 2009.

DAHLBERG, J.; WOLFRUM, E.; BEAN, B.; ROONEY, W. L. Compositional and agronomic evaluation of sorghum biomass as a potential feedstock for renewable fuels. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, v. 5, n. 4, p. 507-513, 2011.

DAVISON, B. H., PARKS, J., DAVIS, M. F.; DONOHOE, B. S. (2013). Plant cell walls: basics of structure, chemistry, accessibility and the influence on conversion. *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals*, 23-38, 2013.

EMBRAPA, 2014. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/4654/sorgo-biomassa-brs-716>. Acesso em: 22 de março de 2020.

EMBRAPA, 2018. Disponível em: file:///C:/Users/DELL/Downloads/CultivodoSorgobiomassadoc-152\_13.pdf. Acesso em 22 de março de 2020.

EMBRAPA, 2019. Disponível em: <https://www.canalrural.com.br/noticias/feiras-e-eventos/biomassa-sorgo-de-seis-metros-e-alternativa-na-geracao-de-energia/> Acesso em 22 de março de 2020.

EPE – Empresa de Pesquisa Energética, 2017. Disponível em: <http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/03/topico-397/Relat%C3%B3rio%20S%C3%ADntese%202018-ab%202017vff.pdf>. Acesso em 18 de março de 2020.

EPE – Empresa de Pesquisa Energética, 2020. Disponível em: [http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-40/topico-74/Cap8\\_Texto.pdf](http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-40/topico-74/Cap8_Texto.pdf). Acesso em 18 de março de 2020.

ESTEGHLALIAN, A. R., BILODEAU, M., MANSFIELD, S. D., ; SADDLER, J. N. (2001). Do enzymatic hydrolyzability and Simons' stain reflect the changes in the accessibility of lignocellulosic substrates to cellulase enzymes? *Biotechnology progress*, 17(6), 1049-1054.

FELIPE, M.G.A., et al. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xilitol by *Candida guilliermondii*. *Journal of Basic Microbiology*, v.35. n.3, p.171-177, 2004.

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

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

FREITA, C. M.; FREITA, L. A.; TRALLI, L.F.; SILVA, A. F.; MENDES, F. Q.; TEIXEIRA, V.; MUTTON, M. J.R. Bioethanol production with different dosages of the commercial AcryLAMide polymer compared to a Bioextract in clarifying sugarcane juice. ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS (ONLINE), v. 89, p. 3093-3102, 2017a.

FREITA, L. A. Produção de etanol de segunda geração utilizando bagaço de sorgo sacarino. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.2017b.

FREITA, C.M; COSTA, G.H.G; MENDES, F.Q; MUTTON, M.J.R; FREITA, L.A. *M. oleífera* LAM seed extract as sugarcane juice clarifier. Ciência ; Tecnologia. v.6. 2014.

FUGITA, T. P. L. Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e

Veterinárias Campus de Jaboticabal, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. 2010.

FULTON, L. M.; LYND, L.R.; KÖRNER, A.; GREENE, N.; TONACHEL, L.R. The need for biofuels as part of a low carbon energy future. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 9, n. 5, p. 476-483, 2015.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, v. 108, p. 41-65, 2007.

GÁMEZ S, GONZÁLEZ JJ, RAMÍREZ JA, GARROTE G, VÁZQUEZ M. Study of the sugarcane bagasse hydrolysis by using phosphoric acid. *J Food Eng.* 2006; 74: 78-88.

GRANBIO, 2017. Disponível em : <http://www.granbio.com.br/conteudos/cana-energia/>. Acesso em: 22 de março de 2020.

GEOCITIES. Fórmula estrutural da celulose. Disponível em: <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Launchpad/9071/celulose.gif>. Acesso em 20 de março de 2020.

GINORIS, Y.P. Avaliação e tratamentos do hidrolisado de eucalipto para produção biotecnológica de xilitol por *Candida guilliermondii*. 2001. Dissertação (Mestrado) - Depto. de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, São

Paulo, 2001.

GRANBIO, 2018. Disponível em:  
<https://www.embrapa.br/documents/1355063/32772467/Jose%CC%81+Bressiani.pdf>  
/69cb6c5f-d27e-a7ef-6285-8a40ac1c3040. Acesso em 22 de março de 2020.

GUALBERTO, A.F.; FERRARI, G.M.; ABREU, K.M.; PRETO, B.; LIMA, FERRARI, J.L.  
Characteristics, properties and potential of *M. oleífera* LAM (*M. oleífera* LAM oleífera  
LAM.): agroecological aspects. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento  
Sustentável. 2014.

GUERRIERO, G., HAUSMAN, J. F., STRAUSS, J., ERTAN, H., ; SIDDIQUI, K. S.  
(2016). Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization.  
Engineering in Life Sciences, 16(1), 1-16.

GINORIS, V.A.M.; ARAUJO, A.V.; MARTÍNEZ, P.A.H.; ALVARENGA, E.M.; DIAS,  
D.C.F.S. Immersion time in toxic solution for vigor evaluation of bean seeds. Journal  
of Seed Science, 36(1), 108-113, 2001.

HARINDER,S.; OBEROI, N.; BABBARSIMRANJEET, K.; SANDHUSANDEEP, S.;  
DHALIWALUJJAL, K.; CHADHAVINOD ,K. B. Ethanol production from alkali-treated  
rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated  
thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. Journal of Industrial Microbiology ;  
Biotechnology. April 2012, Volume 39, Issue 4, pp 557–566, 2012.

HASSUANI, S., LEAL, M., ; MACEDO, I. Biomass power generation: Sugar cane bagasse and trash. PNUD - Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. Pirecicaba: PNUDCTC, 2005.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 10-18, 2009.

HOFFMAN, L.; ROONEY, W. L. Accumulation of biomass and compositional change over the growth season for six photoperiod sorghum lines. In: NATIONAL CONFERENCE SCIENCE FOR BIOMASS FEEDSTOCK PRODUCTION AND UTILIZATION, 2012, New Orleans. Disponível em: <[http://sungrant.tennessee.edu/NR/rdonlyres/430141C3-38B5-4265-BAC4-E89C9239B62A/3278/LeoHoffmann\\_TexasAMUniversity.pdf](http://sungrant.tennessee.edu/NR/rdonlyres/430141C3-38B5-4265-BAC4-E89C9239B62A/3278/LeoHoffmann_TexasAMUniversity.pdf)>. Acesso em: 10 jun. 2013.

IEA – INSTITUTO DE ECONOMIA AGRONÔMICA. Disponível em : <http://www.iea.sp.gov.br/ftpiea/AIA/AIA-19-2017.pdf>. 2017. Acesso 20 de março de 2020.

ISONO N, HAYAKAWA H, USAMI A, MISHIMA T, HISAMATSU M. A comparative study of ethanol production by *Issatchenkia orientalis* strains under stress conditions. *J Biosci Bioeng*. 2012;113:76-78. 2012.

ISONO, N.; HAYAKAWA, H.; USAMI, A.; MISHIMA, T.; HISAMATSU, M. A comparative study of ethanol production by *Issatchenkia orientalis* strains under stress conditions. *J Biosci Bioeng.* 2012 Jan;113(1):76-8. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.09.004. Epub 2011.

JEFFRIES, T.W., LIGHTFOOT, E.N., FADY, J.H. Effect of Glucose Supplements on the Fermentation of Xylose by *Pachsolens tannophilus*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 27, p. 171-176, 2007.

JENKINS, B., BAXTER, L., MILES, T., ; MILES, T. Combustion properties of biomass. *Fuel Processing Technology*, v.54, pp.17-46, 2018.

JIANG, J.; WANG, J.; ZHANG, X.; WOLCOTT, M. Evaluation of physical structural features on influencing enzymatic hydrolysis efficiency of micronized wood. *RSC Advances*, v. 6, p. 103026-103034, 2016.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts ; Biorefining*, v. 1, p. 119-134, Junho 2007.

KELLY, C.; JONES, O.; BARHART, C.; LAJOIE, C. Effect of the furfural, vanillin on *Candida guilliermondii* growth and xylitol biosynthesis. *Biochem, Biotechnol*, 2008.

KRAHULEC, S.; KRATZER, R.; LONGUS, K.; NIDETZKY, B.; KUMAR, B. Comparison of P. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial; Engineering Chemistry Research* , v. 48, p. 3713-3729, Março 2009.

KRAHULEC, K.; KLIMACEK, M.; NIDETZKY, B. Analysis and prediction of the physiological effects of altered coenzyme specificity in xylose reductase and xylitol dehydrogenase during xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biotechnology*, Volume 158, Issue 4, 2012.

LANGE, J.; KEENEY, S.; MOHIBULLAH, N.; Auto-organização da iniciação da recombinação meiótica: princípios gerais e vias moleculares. *Ann Rev Genet.* 48 , 187-214, 2007.

LARSSON, D.E., TATARANNI, P.A., FERRARO, R.T., RAVUSSIN, E. Ad libitum food intake on a "cafeteria diet" in Native American women: relations with body composition and 24-h energy expenditure. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.62, n.5, p.911-917, 2000.

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

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 839 p. 2015.

LEU, S. Y.; ZHU, J. Y. (2013). Substrate-related factors affecting enzymatic saccharification of lignocelluloses: our recent understanding. *Bioenergy Research*, 6(2), 405-415.

LI, Z.; HUANG, C.; BAO, C.; CHEN, L.; LINMWANG, X.; ZHONG, G.; YU, B.; HUW, DAIL. 2015. Exon–intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nature Structural; Molecular Biology* 22: 256–264. 2015.

LIN Y, TANAKA S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006 Feb;69(6):627-42. doi: 10.1007/s00253-005-0229-x. Epub 2005 Dec 6. PMID: 16331454, 2006.

MACRI, R. C. V; COSTA, G. H. G; MONTIJO, N. A; FERREIRA, A. S.; MUTTON, M. J. R. *M. oleífera* LAM extracts used in sugarcane juice treatment and effects on ethanolic fermentation, v.13, p. 4121-4130, 2014.

MANYÀ, J. J.; ARAUZO, J. An alternative kinetic approach to describe the isothermal pyrolysis of micro-particles of sugar cane bagasse. *Chemical Engineering Journal*, v.139, pp.549-561, 2008.

MARTINEZ, E.A., et al. Effects of Ca(OH)<sub>2</sub> Treatment (“Overliming”) on the Composition and Toxicity of Bagasse Hemicellulose Hydrolysate. *Biotechnology and Bioengineering*, v.69, n.5, p.526-536, 2000.

MARTON, J.M. Avaliação de diferentes carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para obtenção biotecnológica de xilitol, 1998. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial)- Escola de Engenharia de Lorena (EEL), 1998.

MARTON, J.M. Avaliação de um sistema contínuo composto por colunas de carvão ativo e resinas de troca iônica para o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia Industrial), p. 131, Escola de Engenharia de Lorena – EEL – USP. Departamento de Biotecnologia, 2001.

MARTON, J.M. et al. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.23, n.1, p.9-21, 2006.

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

MILESSI, T.S.S.; ANTUNES, F.A.F.; CHANDEL, A.K.; SILVA, S.S. Rice bran extract: an inexpensive nitrogen source for the production of the 2G ethanol from sugar cane bagasse hydrolysate. *3 Biotech*. 2013.

MONLAU-BARAKAT, F. OLIVEIRA, L.M.; SCHUCH, L.O.B.; BRUNO, R.L.A.; PESKE, S.T. Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. *Environmental Science and Technology*, v. 43, p. 260–322, Fevereiro 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10643389.2011.604258> Acesso em 22 de março de 2020.

MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. Sugarcane: physiology, biochemistry ; functional biology. Oxford: Wiley Blackwell, 2014. 716p.

MORTON, J. F. The horseradish tree, *M. oleífera* LAM pterygosperma (*M. oleífera* LAMceae) - a boon to arid lands? *Economy Botany*, v.45, n.3, p.318-333. 1991.

MUTTON, M.J.R.; FERRARI, F.C.S.; FREITA, L.A.; FREITA, C.M.; ANDRIETTA, M.G.; ANDRIETTA, S.R.; Interaction between the production of ethanol and glycerol in fed-batch bioreactors. *Braz J Microbiol* 50, 389–394. 2019.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y. HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M., Features of promising Technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 673-686, 2005.

NAKASU, Y. Enhanced 2,3-Butanediol Production by Addition of Acetic Acid in *Paenibacillus polymyxa*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 90, n. 6, p. 661-664, 2015.

NAKAMURA, Y.; SAWADA, T.; INOUE, I. Produção aprimorada de etanol a partir de palha de arroz explodida a vapor tratada enzimaticamente usando fermentação extrativa. *Journal of the Chemical Technology and Biotechnology*, volume 76, 2001.

NEXSTEPPE, Sementes do Brasil Ltda. Disponível em: <http://www.biomassabr.com/bio/detalhes.asp?id=303;idatividade>, 2018. Acesso em 10 de janeiro de 2021.

NUTTAPORN, C.; SUDARAT, T.; PREEKAMOL, K.; PORNTHAP, T. The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production. *Braz. J. Microbiol.* vol.49 no.2 São Paulo Apr./June 2018.

NGUYEN, N. H.; SUH, S. O.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. *Mycological Research, Cambridge*, v. 110, p. 1232-1241, 2006.

NOGUEIRA, L. A. et al. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.

OBEROI H.S.; VADLANI P.V.; BRIJWANI K.; BHARGAV V.K.; PATIL, R.T. Enhanced ethanol production via fermentation of rice straw with hydrolysate-adapted *Candida tropicalis* ATCC 13803. *Process Biochem* 45:1299–1306.2012.

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

OH, Y. H.; OLSON, S.N.; RITTER K.; ROONEY W.; KEMANIAN A.; MCCARL B. A.; ZHANG Y.; HALL, S.; PACKER, D; MULLET, J. Recent advances in development of biomass pretreatment technologies used in biorefinery for the production of bio-based fuels, chemicals and polymers. *Korean Journal of Chemical Engineering*, v. 32, p. 1945–1959, Outubro 2015.

PAGNOCCA, F; OENNING, R.; MARNEY, P. C.; GOMES, E.; MARTINS, G.; SILVA, R. Seleção de cepas de levedura para fermentação de xilose. *Braz. arco. biol. technol.* vol.59 Curitiba, 2015.

PALMQVIST, B; BARBELHAN, H.fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and echanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. Volume 74, Issue 1, August 2000, Pages 25-33. 2000.

PALONEN, Hetti. Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. VTT Technical Research Centre of Finland, 2004.

PARAJÓ, J.C.; ALONSO, J.L.; SANTOS, V. Kinetics of eucalyptus wood fraction in acetic acid-HCl-water media. *Bioresource Technology*, v. 51, p. 153-162, 1996.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H. DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of

xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource technology*, v. 65, p. 191-201, 1997.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H. DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. *Bioresource Technology*, v. 65, p. 203-212, 1998.

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

PATURAU, J. M. By-products of the cane sugar industry: an introduction to their industrial utilization. 3<sup>ed</sup>. Amsterdam: Elsevier, 1989. 435p.

PAUDEL, S. R.; BANJARA, S.P.; CHOI, O.K.; PARK, K.Y.; KIM, Y.M.; LEE, J.W. Pretreatment of agricultural biomass for anaerobic digestion: Current state and challenges. *Bioresource Technology*, v. 245, p. 1194–1205, Stembro 2017.

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

POUMAYE, N, MABINGUI, J, LUTGEN, P, BIGAN, M, Contribution to the clarification of surface water from the *M. oleífera* LAM oleífera: Case M'Poko River to Bangui, Central African Republic. Chemical Engineering Research and Design, v.90, n.12, 2012.

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

RABELO, S.; MARTINS, L.; COSTA, A. Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. Bioresource Technology. 191. 10.1016/j.biortech.2015.05.024. 2011.

RAVANELI, G.C; GARCIA, D.B; MADALENO L.L; MUTTON, M.A; STUPIELLO J.P; MUTON, M.J.R. Spittlebug impacts on sugarcane quality and ethanol production. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.46, n.2, p. 120-129, 2011.

RENOVABIO, Política Nacional de Biocombustíveis. Disponível em: <http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-mp/2019/junho;item=ranp-791-2020>. Acesso em 28/01/2020.

ROONEY, W. L.; BLUMENTHAL, J.; BEAN, B.; MULLET, J. E. Designing sorghum as a dedicated bioenergy feedstock. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, Chichester, v. 1, p. 147-157, 2007.

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

ROVIERO, J.P. Biomassa derivada de cana-de-açúcar e cana energia submetidas a hidrólise ácida e enzimática para produção de etanol. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária, 2017.

RUBIN, M.; KALE, G.; KIJCHAVENGKUL, T.; AURAS, R.; SELKE, S. E.; SINGH, S. P. Compostability of bioplastic packaging materials: An overview. *Macromolecular Bioscience*, v. 7, n. 3, p. 255–277, 2008.

SABERMAS. Representação estrutural das paredes celulares dos vegetais. Disponível em: <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/323-numero-38/587-pared-celular-de-las-plantas-funcion-estructura-y-aplicaciones.html>. Acesso em: 18 de março de 2020.

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

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

SANTUCCI, B. S.; MAZIERO, P.; RABELO, S. C.; CURVELO, A. A. S.; PIMENTA, M. T. B. Autohydrolysis of hemicelluloses from sugarcane bagasse during hydrothermal pretreatment: a kinetic assessment. *Bioenergy Research*, v. 8, p. 1778-1787, 2015.

SANTUCCI, B.S.; Estudo dos efeitos dos tratamentos físicomecânicos na hidrólise da celulose do bagaço de cana-de-açúcar. Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em química.2018.

SILVA, S. Use of a fluidized bed reactor operated in semi-continuous mode for xylose-to-xylitol conversion by *C. guilliermondii* immobilized on porous glass. *Process Biochemistry*, v.38, p.903-907, 2006.

SILVA, A. L. B. B.; SILVA, E. O. da. Conhecendo materiais poliméricos, 2011. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/55442446/54924150-polimeros>>. Acesso em: 18 de março de 2020.

SILVA, A. S.; INOUE, H.; ENDO, T.; YANO, S.; BON, E. P. S. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 7402-7409, 2013.

SILVA, G. G. D.; COUTURIER, M.; BERRIN, J. G.; BULÉON, A.; ROUAU, X. Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw. *Bioresource Technology*, v. 103, p. 192-200, 2012.

SILVA, R.M. Caracterização física química das cinzas de palha de cana-de-açúcar através de análises térmicas simultâneas (STA) / Diego Luis Franco Jacome. – Campinas, SP: [s.n.], 2014.

SILVA-FERNANDES, A.T.; SANTOS, J.C.; HASMANN, F.; RODRIGUES, R.C.L.B.; IZARIO, H.J.; FELIPE, M.G.A. Biodegradable alternative for removing toxic compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates for valorization in biorefineries. *Bioresource Technology*, 2017.

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

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

SOUSA, J. L. U.; Monteiro, R. A. B.; FAZU, F.; Comparison of Scheffersomyces stipitis strains CBS 5773 and CBS 6054 with regard to their xylose metabolism: implications for xylose fermentation.2011.

STONE, E. J.; HOMAN, E. S., MORRIS, H. F.,; FRYE, J. B. Chemical pretreatment of roughages. In journal of animal science (vol. 24, no. 3, p. 910). 1111 north dunlap ave, savoy, il 61874: amer soc animal Science, 1965.

SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. Bioresource Technology, v. 199, p. 49-58, 2016.

SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology, 83:1–11, 2002.

STUPIELLO, J. P., HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. Departamento de Tecnologia Rural - ESALQ, 4, n. 17.,1981.

TAHERZADEH, M. ; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. International Journal of Molecular Sciences, 2008. 1621-1651. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.3390%2Fijms9091621> Acesso em 22 de março de 2020.

TRALLI, L.F. Fermentação de mosto obtido da hidrólise de sorgo sacarino para produção de etanol por *P. kudriavzevii*. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veteriárias - Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária, 2019.

ULLAH, A; MARIUTTI R; MASOOD, R; CARUSO, I.P; COSTA, G.H; FREITA, C.M; MUTTON, M.J.R; Crystal Structure of mature 2S albumin from *M. oleífera* LAM oleífera seeds. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2015.

ÚNICA. A União da Indústria de Cana-de-Açúcar. 2013. Disponível em: <https://unica.com.br/noticias/unica-confirma-realizacao-do-4-ethanol-summit-em-2013/>. Acesso em: 24 de março de 2020.

ÚNICA. A União da Indústria de Cana-de-Açúcar. 2020. Disponível em: <https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/outros-produtos/>. Acesso em 24 de março de 2020.

VENTURA, R. Desenvolvimento de técnicas e avaliações de antimicrobianos visando a produção de etanol carburante. Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.2015.

WALKER, G.M. Yeast Physiology and Biotechnology. John Wiley and Sons Publishers, London, UK, 250 pg, 2008.

WOLBACH, D.J.; THOMPSON, D.A.; GASCH, A.P.; REGEV, A. From elements to modules: regulatory evolution in Ascomycota fungi. *Current Opinion in Genetics ; Development*, 19, 1–8, 2011.

ZAMPIERI, D. Expressão do complexo celulolítico em *Penicillium echinulatum*. Caxias do Sul: UCS, 2011. (Dissertação de Mestrado).

ZHENG, L.; ZHANG, M.; ZHOU, Q.; CHEN, J.; ZENG, F.; BIOSCI., *Biotechnol., Revista Biochem.* 2014.

ZHU, J. Y.; PAN, X.; ZALESNY, R. S. Pretreatment of woody biomass for biofuel production: energy efficiency, technologies, and recalcitrance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 847-857, 2010.