

DOUGLAS GUALBERTO SALES PEREIRA

**RENDIMENTOS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA DE CAPIM-ELEFANTE, CAPIM-ANDROPOGON, CAPIM-
MOMBAÇA E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE
ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P436r
2013

Pereira, Douglas Gualberto Sales, 1984-

Rendimentos da hidrólise enzimática e fermentação
alcoólica de capim-elefante, capim-andropogon,
capim-mombaça e bagaço de cana-de-açúcar para produção de
etanol de segunda geração / Douglas Gualberto Sales Pereira. –
Viçosa, MG, 2013.

xii, 52f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Paulo Henrique Alves da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.44-52.

1. Biocombustíveis. 2. Etanol - Produção.
3. Capim-andropogon, Capim-elefante, Capim-mombaça.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 662.88

DOUGLAS GUALBERTO SALES PEREIRA

**RENDIMENTOS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA DE CAPIM-ELEFANTE, CAPIM-ANDROPOGON, CAPIM-
MOMBAÇA E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE
ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de dezembro de 2013.

Monique Renon Eller
(Coorientadora)

Luciano Gomes Fietto
(Coorientador)

Valéria Monteze Guimarães

Paulo Henrique Alves da Silva
(Orientador)

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

*“Um caminho sem obstáculos
provavelmente não leva a lugar nenhum.”*

Frank Clark

AGRADECIMENTOS

A UFV e ao Departamento de Ciência de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos meus familiares pelo apoio incondicional e incentivo a minha carreira profissional.

Aos meus pais por me incentivarem, me apoiaram e sempre estarem ao meu lado em todos os momentos.

A todos os funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia que de alguma forma me ajudaram em algum momento, em especial aos Ademir, Carlinhos e Pio.

Aos professores do programa de pós-graduação pela transmissão de conhecimentos que foram de suma importância para que pudesse planejar, executar e concluir meu projeto de pesquisa.

Ao professor Paulo Henrique Alves da Silva pela orientação, atenção, apoio e por criar condições que me proporcionaram amadurecimento profissional.

Ao professor Luciano Gomes Fietto e a professora Monique Renon Eller pela coorientação, por estarem sempre dispostos para darem conselhos, esclarecimentos e sugestões. A colaboração de vocês ao projeto de pesquisa foi de grande importância.

Ao professor Jorge Luiz Colodette pelo apoio nas análises por cromatografia que contribuíram de forma significativa aos resultados da pesquisa e aos funcionários do Laboratório de Papel e Celulose pela atenção, seriedade e profissionalismo na execução das análises.

Ao professor Rasmão Garcia pela atenção, apoio e experientes conselhos que contribuíram para a criação do projeto.

Ao professor Paulo Roberto Cecon pela ajuda na estatística e pela atenção.

A Michele Harumi pela amizade, companheirismo e ajuda nos experimentos.

Aos colegas de laboratório Jussara, Brenda, Ariel e Michelle, pela amizade, apoio nos experimentos e por proporcionarem momentos de descontração nesse período de trabalho e estudos. Ao colega Alexandre pelo auxílio nas análises de cromatografia gasosa.

A Izabel por estar sempre ao meu lado, pelo carinho, amor e atenção. O seu apoio foi essencial em todos os momentos desse percurso.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Potencial de produção de etanol de segunda geração	3
2.2. Biomassa lignocelulósica e estrutura química dos seus constituintes.....	4
2.3. Gramíneas forrageiras de interesse para produção de etanol.....	7
2.4. Processo de produção de etanol de segunda geração.....	10
2.4.1. Pré-tratamentos.....	10
2.4.2. Hidrólise enzimática da biomassa e fermentação alcoólica.....	12
2.4.3. Estratégias de hidrólise e fermentação para produção de bioetanol.....	15
3. CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS, PRÉ- TRATAMENTO E AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	17
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4. CAPÍTULO 2 – PRÉ-HIDRÓLISE, FERMENTAÇÃO E SACARIFICAÇÃO SIMULTÂNEAS (SSF) DAS BIOMASSAS.....	28
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32

5. CAPÍTULO 3 – ESTIMATIVAS DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL.....	38
5.1. Produção de etanol a partir de hexoses.....	38
5.2. Produção de etanol a partir de pentoses.....	39
5.3. Perspectivas de produção de etanol.....	40
6. CONCLUSÕES.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura da biomassa lignocelulósica.....	5
Figura 2-	Estrutura química parcial da celulose.....	5
Figura 3-	Estrutura química parcial da hemicelulose.....	6
Figura 4-	Estrutura química parcial da lignina.....	6
Figura 5-	Capim-elefante (<i>Pennisetum purpureum</i>).....	8
Figura 6-	Capim-andropogon (<i>Andropogon gayanus</i>).....	9
Figura 7-	Capim-mombaça (<i>Panicum maximum</i> cv Mombaça).....	9
Figura 8-	Efeitos do pré-tratamento sob a estrutura do complexo lignocelulósico.....	11
Figura 9-	Esquema de hidrólise de celulose por exoglucanases, endoglucanases e β -glicosidases.....	13
Figura 10-	Representação da remoção de hemicelulose do capim-andropogon, bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante e capim-mombaça resultante do pré-tratamento ácido.....	24
Figura 11-	Perfis de hidrólise enzimática, expressas em concentração de açúcares redutores (AR), mg/mL, em função do tempo, das biomassas pré-tratadas com ácido e sem ácido.....	25
Figura 12-	Esquema de hidrólise de celulose por exoglucanases, endoglucanases e β -glicosidases.....	29

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Empresas que empregam tecnologias para a produção de etanol de segunda geração utilizando o processo de hidrólise enzimática.....	3
Tabela 2	Composição de alguns materiais lignocelulósicos com potencial para a produção de etanol de segunda geração.....	7
Tabela 3	Comparação entre a hidrólise ácida e enzimática segundo critérios de pré-tratamento, taxa de hidrólise, temperatura, pressão, rendimento e formação de subprodutos.....	14
Tabela 4	Composição química parcial das matérias-primas secas e moídas, expressos em porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina.....	23
Tabela 5	Comparação de médias das concentrações de AR entre os tempos de hidrólise de 24, 48 e 72 horas, por tipo de amostra.....;	26
Tabela 6	Identificação da composição centesimal dos monossacarídeos constituintes dos hidrolisados de 24 horas por Cromatografia de Troca Iônica.....	27
Tabela 7	Avaliação das concentrações de glicose e rendimentos da pré-hidrólise das amostras de capim-andropogon, bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante e capim-mombaça pré-tratadas.....	34
Tabela 8	Concentrações de etanol, rendimentos por grama de biomassa e glicose obtidos da pré-hidrólise e sacarificação e fermentação simultâneas das amostras.	36
Tabela 9	Rendimentos em etanol para diferentes fontes de biomassa via processo de sacarificação e fermentação simultâneas conduzidos por outros autores, comparativamente aos obtidos neste trabalho.....	37
Tabela 10	Estimativa da produção anual de etanol de segunda geração de bagaço de cana-de-açúcar e dos capins andropogon, elefante e mombaça.....	38
Tabela 11	Concentração de açúcares redutores do filtrado resultante do pré-tratamento ácido.....	39

Tabela 12	Estimativa de produção de etanol via fermentação de pentoses oriundas da hidrólise da hemicelulose pelo pré-tratamento ácido e as produtividades do capim-andropogon, bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante e capim-mombaça.....	40
Tabela 13	Estimativa de produção de etanol a partir tanto pentoses e hexose extraídas de capim-andropogon, bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante e capim-mombaça, via pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

SHF – Sacarificação e Fermentação separados (*Separated Hydrolysis and Fermentation*)

SSF – Sacarificação e Fermentação simultâneas (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*)

SAS – *Statistical Analysis System*

HMF – Hidroximetilfurfural

FDA – Fibra em detergente ácido

FDN – Fibra em detergente neutro

FPU – Unidades de filtro de papel (*Filter paper units*)

RPM – Rotações por minuto

ART – Açúcares redutores

YPD – Extrato de levedura, peptona e dextrose

PAG – Polialquilglicol

MS – Matéria seca

$Y_{G/B}$ – Rendimento de glicose/g de biomassa

$Y_{G/C}$ – Rendimento de glicose/g de celulose

$Y_{E/B}$ – Rendimento de etanol/g de biomassa

$Y_{E/G}$ – Rendimento de etanol/g de glicose

RESUMO

PEREIRA, Douglas Gualberto Sales, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2013. **Rendimentos da hidrólise enzimática e fermentação alcoólica de capim-elefante, capim-andropogon, capim-mombaça e bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração.** Orientador: Paulo Henrique Alves da Silva. Coorientadores: Monique Renon Eller e Luciano Gomes Fietto.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de etanol de segunda geração utilizando como fontes de biomassa capim-elefante (*Penisetum purpureum*), capim-mombaça (*Panicum maximum*), capim-andropogon (*Andropogon gayanus*) e comparar seus rendimentos aos obtidos utilizando bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). Os materiais foram submetidos a pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído 1 %, a 121 °C em autoclave por 30 minutos. As amostras pré-tratadas foram submetidas à hidrólise enzimática conduzida por celulasas, 20 FPU/g, por período de 72 horas com o intuito de avaliar o perfil hidrolítico e determinar o tempo de pré-hidrólise para a etapa subsequente de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). A pré-hidrólise das biomassas pré-tratadas foi realizada a 60 °C por 24 horas e a fermentação conduzida por uma linhagem termotolerante de *Saccharomyces cerevisiae*, denominada LBM-1, a 37 °C por 48 horas. Avaliou-se os efeitos do pré-tratamento na remoção da fração hemicelulósica das biomassas e a influência deste pré-tratamento nos rendimentos da hidrólise enzimática, sendo observado que o pré-tratamento foi efetivo na remoção da fração hemicelulósica e que houve diferença de até 33 % nos percentuais de remoção deste fração entre as biomassas. Entretanto os efeitos do pré-tratamento não resultaram em diferentes rendimentos de hidrólise enzimática entre as amostras. O processo de sacarificação e fermentação simultâneas resultou rendimentos semelhantes de hidrólise e de etanol produzido para as quatro biomassas avaliadas. Os rendimentos de hidrólise e produção de etanol foram, em média, de 0,16 g de glicose/g de biomassa, e de 0,14 g de etanol/g de biomassa. A similaridade dos rendimentos, nas condições empregadas, das fontes de biomassa testadas, aliada às suas produtividades anuais em matéria seca, assinalam como potenciais fontes alternativas de biomassa para a produção de etanol de segunda geração.

ABSTRACT

PEREIRA, Douglas Gualberto Sales, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2013. **Yields of enzymatic hydrolysis and alcoholic fermentantion of gamba grass, guinea grass, elephant grass and sugarcane bagasse for second generation ethanol production.** Adviser: Paulo Henrique Alves da Silva. Co-advisers: Monique Renon Eller and Luciano Gomes Fietto.

This study aimed to assess second generation ethanol production by using as biomass sources the elephant grass (*Penisetum purpureum*), the guinea grass (*Panicum maximum*) and the gamba grass (*Andropogon gayanus*) as well as comparing their yields to those which uses sugarcane bagasse (*Saccharum spp.*). For the material pretreatment, diluted acid, H₂SO₄ 1% at 121 °C in autoclave for 30 minutes was used. Pretreated samples underwent enzymatic hydrolysis conducted by cellulases, 20 FPU/g, for 72 hours in order to assess the hydrolytic profile and determine the prehydrolysis timing for the following stage of simultaneous saccharification and fermentation (SSF). Prehydrolysis from pretreated biomass was carried out at 60 °C for 24 hours and fermentantion was conducted by using a thermotolerant strain of *Saccharomyces cerevisiae*, named LBM-1, at 37 °C for 48 hours. Pretreatment effects on the removal of hemicelluloses fraction from the biomasses and its influence in enzymatic hydrolyses yield were evaluated. The pretreatment was effective in removing the hemicelluloses fraction and the percentage of removal showed differences for each biomass. Pretreatment effects did not result in different enzymatic hydrolysis yields among the samples. The SSF process resulted in similar hydrolysis yields among the four raw materials evaluated, as well as the ethanol volumes produced. The yields of hydrolysis and ethanol produced were average, 0,16g of glucose and 0,14g of ethanol per gram of biomass. Under the conditions applied, the similarity among the yields from the sources of biomass used, coupled with their annual yields of drought matter, highlight them as a potential alternative source of biomass for second generation ethanol production.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A busca por fontes renováveis de energia tem levado ao desenvolvimento de tecnologias alternativas aos processos convencionais. Os biocombustíveis têm demonstrado um grande potencial para a substituição dos derivados do petróleo. Existem diversas fontes disponíveis para a produção destes novos tipos de combustíveis, e como se trata de fontes vegetais, pode-se garantir a continuidade da produção e com isto evitar uma eventual crise de abastecimento energético. Cana-de-açúcar, milho, sorgo, palha, resíduos de madeiras, gramíneas, dentre outros, são exemplos de matérias-primas interessantes para a produção de bioetanol.

A instalação de biorrefinarias para a transformação de matérias-primas renováveis e seus resíduos em biocombustíveis tem se intensificado nos últimos anos. Fato este, um reflexo dos grandes investimentos realizados pelos governos tanto na pesquisa quanto nas indústrias. Somente no Brasil, em 2005 foram produzidos 350 mil toneladas de biomassa, sendo esta, em sua maioria, resíduos gerados da agricultura. Aliando estes à extensa área para o plantio de vegetais de alta produtividade e baixo custo, como as forrageiras tropicais, o país se destaca quanto ao potencial para a produção de etanol de segunda geração.

O processo para a obtenção do etanol de segunda geração baseia-se na fermentação de açúcares derivados da hidrólise de celulose. Atualmente a via enzimática tem sido preferida por apresentar uma alta especificidade ao substrato, rendimentos significativos, e não gerar resíduos que causam danos ao meio ambiente. Os avanços tecnológicos e o aumento de escala de produção têm tornado sua utilização cada vez mais viável.

No processo tecnológico, antes que as cadeias de celulose possam ser hidrolisadas, pode ser necessária a aplicação de pré-tratamento sob a biomassa uma vez que a característica recalcitrante, devido à forte associação entre os constituintes da parede celular dos vegetais, celulose, hemicelulose e lignina, dificulta o acesso das enzimas celulolíticas ao substrato. Alguns métodos desenvolvidos para romper esse complexo lignina-hemicelulose-celulose foram sugeridos ao longo das duas últimas décadas. O pré-tratamento com ácido sulfúrico é um dos métodos mais utilizados para a redução da

recalcitrância. O ácido sulfúrico age hidrolisando as cadeias de hemicelulose de forma eficiente e aumentando, assim, a acessibilidade das enzimas à cadeia de celulose.

Aproveitando os avanços já obtidos em pesquisas bioenergéticas com biomassas lignocelulósicas como o bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), outras matérias-primas ou resíduos lignocelulósicos podem ser avaliados para a produção de etanol. As gramíneas forrageiras tropicais são opções à obtenção de energia a partir das biomassas. Capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), por exemplo, é um dos capins mais produtivos, podendo chegar a 30 toneladas de biomassa por hectare anuais. Já o capim-mombaça (*Panicum maximum*), é uma alternativa, por também ser de alta produtividade (15 a 30 t. ha⁻¹ ano⁻¹) e propagado por semente, assim como o capim-andropogon (*Andropogon gayanus*) (12 t. ha⁻¹ ano⁻¹). As plantas forrageiras são materiais promissores para produção de etanol uma vez que não apresentam problemas relativos à sazonalidade, não competem com a produção de alimentos, e apresentam características de alta produtividade e facilidade de adaptação a várias regiões do país.

O presente estudo visa à produção de etanol a partir do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), capim-andropogon (*Andropogon gayanus*), capim-mombaça (*Panicum maximum* cv Mombaça) e bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), via pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e processo de sacarificação e fermentação simultâneas.

A parte experimental do presente estudo foi dividida em duas etapas. A primeira consistiu em pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática dos vegetais. Nesta etapa, foram avaliados os efeitos do pré-tratamento sobre a composição química das biomassas assim como o perfil do aumento da concentração de açúcares redutores em 72 horas durante a hidrólise enzimática e a definição do tempo de pré-hidrólise. Na segunda etapa foram realizados o pré-tratamento, seguido de pré-hidrólise e sacarificação e fermentação simultâneos. Foram avaliados os teores de açúcares redutores ao final da pré-hidrólise e os teores de etanol ao término da fermentação para os cálculos de rendimentos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Potencial de produção de etanol de segunda geração

Nos últimos anos o interesse pelo uso do etanol como combustível tem motivado muitas pesquisas que objetivam a produção de etanol da celulose presente em materiais lignocelulósicos (ROBERTO, 2007).

Alguns países como EUA, Japão, Finlândia, Canadá, Suécia e Rússia já possuem instaladas algumas indústrias para a produção de etanol lignocelulósico empregando processos de hidrólise tanto química quanto enzimática. Na Tabela 1 constam as mais importantes empresas que vêm empregando tecnologias de hidrólise enzimática para a produção de etanol de segunda geração (em fase de demonstração) e informações complementares como localização e capacidade instalada.

Tabela 1: Empresas que empregam tecnologias para a produção de etanol de segunda geração utilizando o processo de hidrólise enzimática.

Empresa	País de origem	Localização	Capacidade (L.ano ⁻¹)
AE Biofuels	EUA	Montana	567.000
logen	Canadá	Ontario	4.000.000
KI. Energy	EUA	Wyoming	5.680.000

Fonte: PEREIRA JÚNIOR, 2010.

Neste contexto, o Brasil se encontra em uma posição privilegiada para assumir a liderança no aproveitamento integral das biomassas pelo fato de possuir a maior biodiversidade do planeta; possuir intensa radiação solar; água em abundância; diversidade de clima e pioneirismo na produção de biocombustíveis a partir da cana-de-açúcar em larga escala (PEREIRA JÚNIOR, 2010). Além disso, possui uma extensa área cultivável, constituindo assim um grande potencial para plantio de vegetais que podem servir como fontes alternativas de matéria-prima para a produção do etanol lignocelulósico.

O interesse pela produção do etanol de segunda geração vem aumentando de forma significativa entre os cientistas e empresas. Além da Petrobrás, que possui uma instalação piloto em seu centro de Pesquisas (Cenpes) para a produção de etanol de segunda geração, a Graalbio irá inaugurar no início de 2014 a primeira fábrica de etanol celulósico do país com

a capacidade para produzir 82 milhões de litros por ano, no estado de Alagoas. Já no estado de São Paulo, a CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) iniciará, em estágio pré-comercial, a produção de etanol de segunda geração, utilizando resíduos oriundos da cana-de-açúcar, a partir de 2014, com previsão de produção de três milhões de litros de etanol por safra (FREITAS, 2013).

2.2. Biomassa lignocelulósica e estrutura química dos seus constituintes

A lignocelulose é o material orgânico mais abundante no planeta e tem como principal constituinte a celulose. Estima-se que a quantidade total deste complexo no planeta esteja por volta de 7×10^{11} toneladas (COUGHLAN, 1985). A parede celular dos vegetais é constituída principalmente de celulose (33-51 %), hemicelulose (19-34 %) e lignina (10-20 %) que fazem parte da parede celular dos vegetais e desempenham um importante papel na sustentação do vegetal.

Existe uma grande variedade de matérias-primas potenciais para a produção de etanol combustível. Gramíneas, madeiras, subprodutos de colheitas e outros resíduos que contenham celulose (incluindo resíduos agrícolas, florestais e da indústria de papel), são todos exemplos de fontes de material lignocelulósico (VAN MARIS *et al*, 2006; WILKINS *et al*, 2008). A natureza e disponibilidade de matérias-primas lignocelulósicas em diferentes partes do mundo dependem do clima e outros fatores ambientais, práticas agrícolas e desenvolvimento tecnológico (CLAASSEN *et al*, 1999). As longas fibras celulósicas são recobertas pelas hemiceluloses (polissacarídeos ramificados formados principalmente por D-xilose com pequenas quantidades de L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, ácido glucurônico e ácido manurônico) e ligninas (redes poliméricas tridimensionais formadas por unidades fenilpropano interligadas).

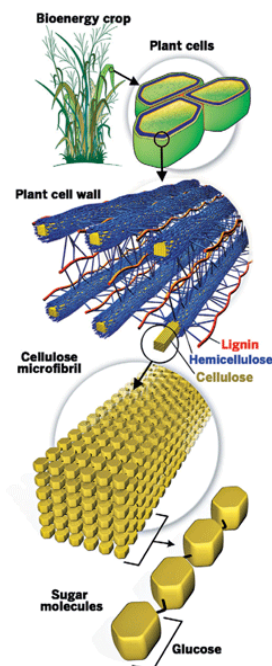


Figura 1: Estrutura da biomassa lignocelulósica
Fonte: RITTER, 2008

A celulose é um polímero linear de unidades de D-glicose unidas entre si através de ligação β -1,4 com grau de polimerização que pode variar de 2.000 a 25.000 (KUHAD, SINGH E ERIKSSON, 1997). De uma forma mais detalhada, as cadeias de celulose são mantidas por inúmeras ligações de hidrogênio intra e intermoleculares as quais são responsáveis pela formação de microfibrilas rígidas, insolúveis e cristalinas. Os compostos celulósicos são estruturalmente heterogêneos e possuem regiões tanto amorfas quanto cristalinas em sua cadeia (WYMAN *et al*, 2005). A cristalinidade da celulose está diretamente relacionada com o elevado número de ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose.

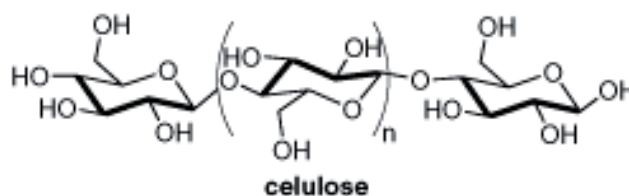


Figura 2. Estrutura química parcial da celulose
Fonte: FERREIRA E ROCHA, 2009

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos compostos por D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico. Porém, sua natureza química varia de acordo com tipo de tecido vegetal e espécie da planta. Sua estrutura apresenta ramificações que interagem com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (FENGEL e WEGENER, 1989; ATALLA, 1988; RYDHOLM, 1965).

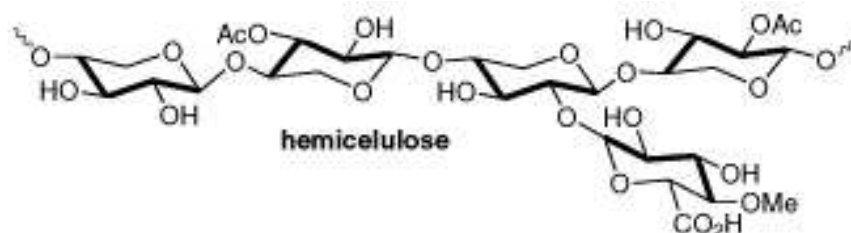


Figura 3. Estrutura química parcial da hemicelulose
Fonte: FERREIRA E ROCHA, 2009

Já lignina é um polímero vegetal derivado dos compostos fenólicos álcool trans-para-cumárico, álcool-trans-coniferílico e álcool-trans-sinapílico. A lignina, juntamente com a hemicelulose e a pectina, preenche os espaços entre as fibras de celulose, além de atuar como material ligante entre os componentes da parede celular (FERRAZ, 2001).

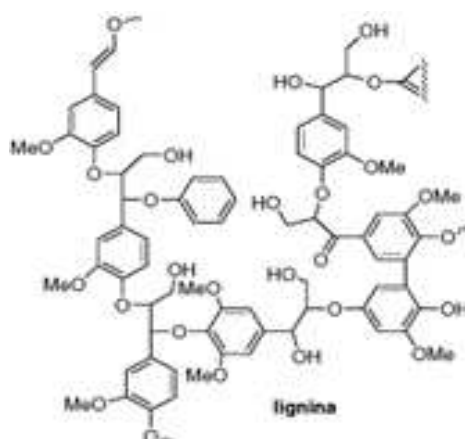


Figura 4. Estrutura química parcial da lignina
Fonte: FERREIRA E ROCHA, 2009.

2.3. Gramíneas forrageiras de interesse para produção de etanol

Diversas gramíneas forrageiras apresentam potencial para geração de energia. A produção de etanol de segunda geração a partir desses vegetais tem sido estudada, principalmente, em países europeus e norte-americanos, tendo como foco algumas espécies dos gêneros *Cynodon* (grama bermuda), *Giant*, *Miscanthus* e *Panicum* (Switchgrass). Além destes, também têm sido testados diversos resíduos lignocelulósicos como bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, de milho, de cana-de-açúcar e aqueles gerados em indústrias de papel os quais apresentam diferente composição química (Tabela 2).

Tabela 2. Composição de algumas biomassas lignocelulósicas com potencial para a produção de etanol de segunda geração.

Composição (% base seca)			
Substrato	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Palha de arroz	35	25	12
Palha de trigo	30	50	20
Palha de milho	42	21	8
Bagaço de cana	40	24	25
Capim elefante	37	30	5
Capim andropógon	29	31	6
Capim mombaça	29	30	4

Fonte: SAHA E COTTA, 2003; SAHA, 2006; RODRIGUES *et al*, 2004.

O capim elefante (*Pennisetum purpureum*) pode ser considerado uma fonte renovável promissora para produção de álcool, dado sua produtividade anual (em média de 30 t.ha⁻¹.ano⁻¹) e as suas características químicas (ROSSI, 2010). Este vegetal é uma gramínea semelhante à cana, trazida da África há mais de meio século, usada comumente como alimento para o gado e é reconhecidamente, uma das forrageiras de mais alto potencial produtivo, adaptando-se muito bem às condições de clima e solo de praticamente todo o Brasil (VILELA, 2009). Adapta-se a altas temperaturas e umidade e tolera temperaturas baixas antes de interromper o crescimento. Apresenta estrutura morfológica bastante semelhante à do bagaço de cana-de-açúcar com 65 % de fibras e 35 % de material não fibroso. De acordo com dados de Campos *et al*.

(2002), a variedade de capim elefante *cv Napier* possui 37% de celulose, 30 % de hemicelulose, 5 % de lignina e cerca de 10 % de carboidratos não estruturais, a 105 dias de maturação.

Por ser uma espécie de alta eficiência fotossintética, resulta em uma grande capacidade de acúmulo de matéria seca, possuindo características quantitativas que credenciam a ser estudadas para a produção de energia, como por exemplo, um percentual de fibra elevado (QUESADA, 2001).



Figura 5. Capim-elefante (*Pennisetum purpureum*)

O capim *A. gayanus* é considerado uma das gramíneas mais adaptadas às savanas tropicais e, atualmente, é amplamente utilizado como pastagem cultivada no Brasil, estando entre as forrageiras com maior área cultivada, juntamente com as espécies dos gêneros *Brachiaria*, *Panicum*, *Pennisetum* e *Cynodon*, principalmente nas áreas de Cerrado (RIBEIRO JUNIOR, 2013). Foi introduzido no Brasil, em 1977, com o nome de cultivar Planaltina, se destacando em relação às demais gramíneas forrageiras por adaptar-se às condições de clima e solo do cerrado brasileiro (BATISTA E GODOY, 1995). Originário da África Central, o capim-andropógon (*Andropogon gayanus*) é uma gramínea forrageira amplamente difundida em áreas com prolongada estação seca e com solos ácidos e de baixa fertilidade (THOMAS *et al.*, 1981). Apresenta, também, uma boa rebrotação após passagem de fogo, sendo tolerante ao pisoteio e a algumas pragas e produz anualmente 12 t/ha de

massa seca, sendo, em média, 21 % desse valor obtido durante o período seco (BOTREL, ALVIM E XAVIER, 1999; MEJÍA, 1984).



Figura 6. Capim-andropon (*Andropogon gayanus*)

Já o capim-mombaça (*Panicum maximum*) sempre despertou muito interesse entre os pesquisadores, por ser uma das forrageiras tropicais mais produtivas e de ampla adaptabilidade (JANK, 1995).

A espécie *Panicum maximum* cv. Mombaça é uma cultivar de alta produtividade, com elevada porcentagem de folhas durante o ano e, principalmente durante a estação seca, destacando-se por apresentar excelentes respostas à adubação, ampla adaptabilidade e menor estacionalidade de produção quando comparado a outras cultivares da espécie (MULLER, 2000).



Figura 7. Capim-mombaça (*Panicum maximum* cv Mombaça)

Esta cultivar possui exigência média a alta na questão de fertilidade de solos, isto quer dizer que em solos de baixa fertilidade, atinge seu ápice de produção com ótima resposta sendo adubado. (VILELA, 2009). De acordo com

Jank (1995) o capim mombaça (*Panicum maximum*) pode atingir uma produção de massa seca anual em torno de 33 t/ha.

2.4. Processo de produção de etanol de segunda geração

No processo de produção do etanol de segunda geração, submete-se a biomassa a uma etapa de preparo, que pode incluir lavagem, secagem, moagem e peneiramento. Após esta, aplica-se um pré-tratamento para que haja o rompimento do complexo celulose-hemicelulose-lignina. Durante a hidrólise, as ligações β 1-4 das cadeias de celulose são rompidas liberando unidades de D-glicose que são convertidas em etanol via fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*.

2.4.1. Pré-tratamentos

Em geral, as biomassas lignocelulósicas são resistentes à bioconversão e requerem um pré-tratamento para tornar a celulose mais acessível à etapa de hidrólise (figura 8) (RABELO, 2007). Isto implica na ruptura do complexo celulose-hemicelulose-lignina tornando, assim, a celulose mais acessível. Estes processos podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação destes, o que dependerá do grau de separação requerido e do fim a que se destina o processo (RAMOS, 2000).

Em processos de pré-tratamento ácidos, podem ser utilizados: ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorídrico, ácido fosfórico diluídos ou ácido peracético. É um dos métodos mais comumente utilizados para melhorar a hidrólise da celulose. Uma das principais vantagens desse tipo de tratamento é a eficácia com a maioria das matérias primas lignocelulósicas (GUPTA, 2008).

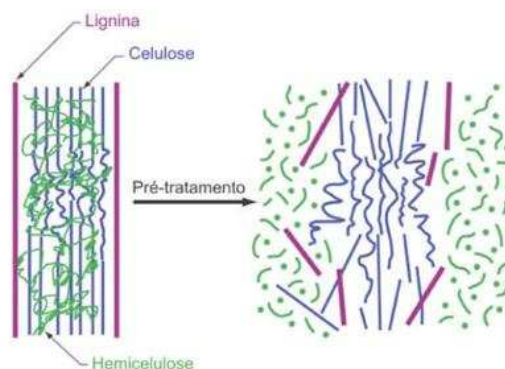


Figura 8. Efeitos do pré-tratamento sob a estrutura do complexo lignocelulósico

Fonte: KONDO, 1997

Porém durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica com ácidos, vários subprodutos químicos podem ser gerados, os quais podem inibir os micro-organismos fermentadores caso estejam em altas concentrações. Entre muitos compostos inibidores, o 2-furaldeído (furfural) e o 5-hidroximetil-2-furaldeído (5-hidroximetilfurfural, HMF) são produzidos durante o pré-tratamento da biomassa, especialmente com ácido diluído. Estes inibidores danificam as paredes e membranas celulares, inibem o crescimento celular, reduzem atividades enzimáticas, causam danos ao DNA, inibem a síntese de proteínas e RNA, e reduzem a produção de etanol (LIU *et al.*, 2004; VAN MARIS *et al.*, 2006; LIU, MA E SONG, 2009). Alguns autores afirmam que o efeito inibitório sob o metabolismo celular por estes compostos se torna relevante em concentrações acima de 1 g/L (NAVARRO, 1994; DELGENES, MOLLETA E NAVARRO, 1996; TAHERZADEH *et al.*, 1997; PALMQVIST AND HAHN-HAGERDAH, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2009).

Uma vez que tanto a eficácia do pré-tratamento ácido, quanto à formação desses compostos, estão relacionados à combinação de temperatura, concentração do ácido e período reacional, torna-se necessário uma escolha criteriosa de cada um desses fatores. Tal combinação tem sido objeto de estudo há muitos anos e sua escolha busca alcançar, além de um bom rendimento de hidrólise e reduzida formação de compostos inibidores, baixos custos. Dessa forma, não existe uma condição ótima que favoreça todos estes fatores, já que o emprego de condições mais drásticas de temperatura, concentração do ácido e tempo, que por um lado melhoram a acessibilidade das enzimas à celulose pela redução da recalcitrância, por outro, implicam em aumento da formação de compostos inibidores e do custo do processo.

Condições intermediárias como a concentração em torno 1 % (p/v) de ácido sulfúrico, temperatura de até 140 °C, com tempo reacional de até 60 minutos, têm mostrado boa eficácia na redução da recalcitrância da matéria-prima e reduzidos teores de furfural e hidroximetilfurfural. Redding *et al.* (2011), avaliou o efeito do pré-tratamento ácido em grama Bermuda, em diferentes condições de temperatura (120 a 180 °C), concentração do ácido (0,3 a 1,2 % p/p) e tempo reacional (5 a 60 minutos), no aumento do rendimento da hidrólise enzimática e considerou o pré-tratamento a 140 °C, 1,2 % de ácido por 30 minutos vantajoso no que se refere a rendimento de hidrólise e reduzida formação de compostos inibidores.

Mesmo sendo o pré-tratamento com ácido diluído uma das formas mais antigas e estudadas para a redução da recalcitrância da lignocelulose, esta, atualmente, ainda é considerada uma das opções mais viáveis economicamente para a aplicação em larga escala pelas indústrias (REDDING *et al.*, 2011; SUN E CHENG, 2002; MOISIER *et al.*, 2005; EGGEMAN E ELANDER, 2005).

2.4.2. Hidrólise enzimática da biomassa e fermentação alcoólica

Existem várias rotas de hidrólise, sendo a hidrólise ácida e hidrólise enzimática as mais estudadas. Embora a hidrólise ácida de biomassa seja eficiente e relativamente barata, gera resíduos poluentes e produtos que inibem a fermentação posterior. Por isso, a sacarificação enzimática tem sido objeto de grande parte dos estudos. O processo enzimático oferece potencial de redução de custos em longo prazo, pois é possível se atingir rendimentos próximos dos estequiométricos e em condições menos críticas de temperatura, pressão e agressividade química, além do processo ser menos poluente (DE AGUIAR, 2010).

A hidrólise enzimática da celulose é catalisada por enzimas altamente específicas que são chamadas de celulasas. Três classes de enzimas constituem o complexo celulolítico: 1) exo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.91), que hidrolisam a cadeia celulósica a partir de suas extremidades liberando celobioses, 2) endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4), que hidrolisam a cadeia

celulósica internamente de maneira aleatória, e 3) 1,4- β -Dglucosidases (EC 3.2.1.21), que promovem a hidrólise da celobiose em glicose e podem também clivar unidades glicosídicas a partir de celuligossacarídeos (figura 9). Coletivamente chamadas de celulases, atuam em sinergia para hidrolisar a celulose criando sítios acessíveis umas para as outras e aliviando problemas de inibição pelos produtos (ERIKSSON, KARLSSON E TJERNELD, 2002; VIALJAMAE *et al.*, 2003; CANILHA *et al.*, 2010).

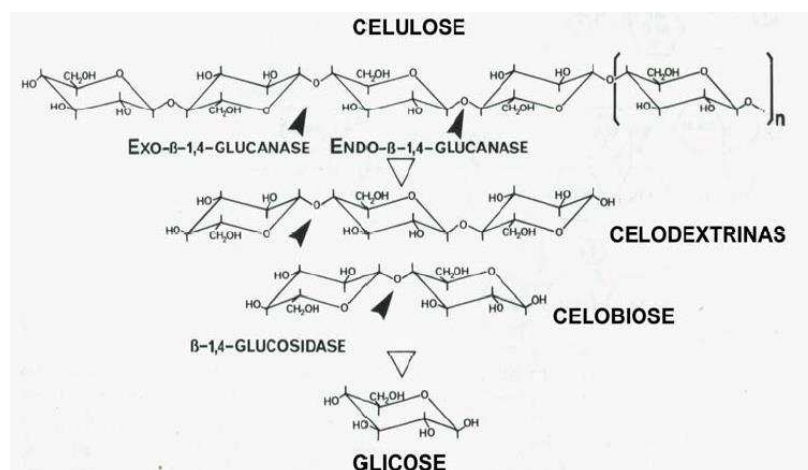


Figura 9. Esquema de hidrólise de celulose por exoglucanases, endoglucanases e β -glicosidases.

Fonte: MALBURG *et al.*, 1992.

Os rendimentos de hidrólise enzimática podem ser influenciados por diferentes fatores, relacionados às características do complexo lignocelulósico, da enzima e das condições empregadas no processo de hidrólise. O aumento na porosidade e da área superficial da lignocelulose facilita o acesso das enzimas ao substrato, enquanto que a maior cristalinidade da celulose dificulta tal acesso devido à preferência dessas enzimas por regiões amorfas (RAMOS, 2000).

Durante o processo de hidrólise a ação catalítica das enzimas pode ser influenciada por efeito de inibição das celobio-hidrolases pelo produto de hidrólise, a celobiose. Além deste, as celulases podem ser inativadas devido à adsorção pela lignina presente no meio reacional ou desnaturadas pelo efeito de tempo, temperatura e agitação (SHULER E KARGI, 1992).

Duff e Murray (1996), afirmam que o custo da hidrólise enzimática é muitas vezes mais baixo se comparado com a hidrólise ácida uma vez que a

hidrólise é usualmente conduzida em condições suaves (pH 4,8; e temperatura 45-50 °C), além de não apresentar problemas de corrosão nos equipamentos. A hidrólise enzimática pode ser considerada superior à hidrólise ácida, em vários aspectos (Tabela 3) (KRISHNA *et al.*, 2000).

O mercado de celulasas tem se expandido drasticamente devido às pesquisas envolvendo hidrólise enzimática de materiais celulósicos pré-tratados, os quais são fermentados para produzir *commodities*, como bioetanol, em larga escala (ZHANG, 2006). Dessa forma, espera-se que os processos enzimáticos tenham seus custos bastante reduzidos com o avanço da tecnologia envolvida e venham a ser a melhor opção no futuro (RABELO, 2007).

Tabela 3. Comparação entre a hidrólise ácida e enzimática segundo critérios de pré-tratamento, taxa de hidrólise, temperatura, pressão, rendimento e formação de subprodutos.

Parâmetro	Hidrolise ácida	Hidrólise enzimática
Pré-tratamento	Pode ser necessário	Necessário
Taxa de hidrólise	Rápida (min.)	Lenta (h)
Temperatura	Alta (200 °C)	Baixa (45 °C)
Pressão	Alta	Atmosférica
Rendimento	Depende do material e do processo	Depende do material e do processo
Formação de subprodutos	Provável formação	Não há formação

Fonte: KRISHNA, 2000

Já fermentação alcoólica é um fenômeno bioquímico muito complexo que provoca a transformação do açúcar em etanol, gás carbônico, ácido succínico, ácidos voláteis, ésteres, etc (LEHNINGER *et al.*, 2000).

Linhagens de *S. cerevisiae* são capazes de fermentar glicose a altas taxas, até mesmo em condições aeróbicas. Em condições anaeróbicas, a taxa de produção de etanol em meio definido pode ser tão alta quanto 30 mmol g biomassa⁻¹ h⁻¹ a 30 °C (BAKKER *et al.*, 2000). Essas são amplamente utilizadas pelo setor sucro-energético brasileiro por possuírem uma combinação de alta eficiência fermentativa com prolongada persistência na safra. Algumas destas linhagens tornaram-se disponíveis comercialmente no final da década de 1990, e, atualmente, mais da metade das destilarias brasileiras usam uma ou, mais comumente, a mistura de duas ou mais, destas

linhagens selecionadas para iniciar o processo fermentativo, produzindo bilhões de litros de etanol por ano. Entretanto, *S. cerevisiae* são incapazes de assimilar ou fermentar xilose, o principal constituinte da fração hemicelulósica da biomassa (BASSO *et al.*, 2008).

A glicose obtida da hidrólise da celulose pode facilmente ser fermentada por micro-organismos existentes como é feito atualmente. Já da fração hemicelulósica são extraídas hexoses, e também pentoses, conhecidas como açúcares in fermentescíveis por linhagens comuns de *Saccharomyces cerevisiae*. Consequentemente, as tecnologias de fermentação que utilizam as pentoses necessitam ser bem desenvolvidas para realçar a eficiência total do processo da conversão (LEE, 1997).

2.4.3. Estratégias de hidrólise e fermentação para produção de bioetanol

As estratégias estudadas para a produção do bioetanol de segunda geração envolvem diferentes abordagens e níveis de complexidade. A hidrólise e fermentação em separado (SHF – *Separated Hydrolysis and Fermentation*) e a hidrólise e fermentação simultâneas (SSF - *Simultaneous Saccharification and Fermentation*) apresentam vantagens e desvantagens como descrito a seguir.

No processo de SHF a hidrólise enzimática da biomassa ocorre em um reator e o conteúdo, ao término da hidrólise, é transferido a outro reator para que se proceda a fermentação, convertendo os açúcares fermentescíveis em etanol. Sua principal vantagem consiste na possibilidade de realizar tanto a hidrólise enzimática quanto a fermentação em suas condições ótimas de temperatura. A temperatura para atividade ótima das celulasas está entre 45 °C e 50 °C. Já para a fermentação, a temperatura varia entre 30 °C e 37 °C. Por outro lado, este processo apresenta a desvantagem de ocorrer a inibição do complexo de celulasas pela glicose e celobiose liberadas durante a hidrólise enzimática causando a conversão incompleta da celulose e baixos rendimentos e maior risco de contaminação devido ao longo de tempo de hidrólise (OLSSON *et al.*, 2006; WINGREN *et al.*, 2005; TAHERZADEH E KARIMI, 2007

A sacarificação e fermentação simultâneas (SSF- *Simultaneous Saccharification and Fermentation*) é um processo que combina a hidrólise enzimática e fermentação em um só reator, evitando a inibição da celulase pela glicose resultante da hidrólise. Entretanto, este processo não evita a inibição causada pela celobiose, já que as leveduras industriais que fermentam glicose não conseguem fermentá-la. Esta abordagem leva a rendimento mais alto, menor tempo de fermentação e riscos menores de contaminação, devido à temperatura alta, presença de etanol e condições anaeróbicas.

Apesar destas vantagens, a SSF tem alguns pontos negativos, entre eles as diferentes temperaturas ótimas para hidrólise (45-50 °C) e fermentação (30-37 °C) e a inibição dos microrganismos fermentativos e da celulase pelo etanol e por substâncias tóxicas vindas do pré-tratamento do material lignocelulósico (SZCZODRAK E FIEDUREK, 1996). A combinação de hidrólise e fermentação, além de reduzir o efeito inibitório, reduz o número de reatores necessários e, conseqüentemente, menor custo de investimento. De acordo com Wingren, Galbe e Zacchi (2003), estima-se que uma redução de até 20 % no capital de investimento pode ser alcançada.

3. CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS, PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO E AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Estudos com diversas gramíneas têm sido realizados com o intuito de utilizá-las como fontes de biomassa para geração de energia. Tais plantas diferem quanto ao potencial produtivo, as propriedades físico-químicas da biomassa, as demandas ambientais e às necessidades de manejo. Capim-elefante, capim-mombaça e capim-andropogon são plantas bem difundidas, adaptadas às condições climáticas do Brasil, apresentam alta produtividade, além de elevados teores de celulose, principal substrato para hidrólise enzimática e baixos teores de lignina que influenciam na recalcitrância das biomassas (EMBRAPA, 2012).

Este capítulo tem por objetivo descrever a coleta das amostras, seu preparo, a caracterização quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina, a aplicação de pré-tratamento com emprego de solução de ácido sulfúrico diluído 1% a 121 °C, por 30 minutos, com o intuito de avaliar os efeitos dessas condições na remoção da hemicelulose das biomassas, assim como avaliar o perfil da hidrólise enzimática, em 72 horas, das biomassas pré-tratadas para determinar o tempo ideal de pré-hidrólise.

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1. Coleta e preparo das matérias-primas

As amostras, compostas por uma mistura de caule e folhas, de capim elefante (*Pennisetum purpureum*), capim-andropogon (*Andropogon gayanus*), e capim-mombaça (*Panicum maximum*), foram coletadas no canteiro de cultivo de forrageiras situado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras em Janeiro de 2013. Na data de coleta os vegetais apresentavam um tempo de maturação acima de 120 dias. Já o bagaço de cana de açúcar, seco e fracionado, foi coletado em uma destilaria localizada no interior do estado de São Paulo.

As amostras de capim foram cortadas em frações de cerca de 2 cm e secas em estufa a 65 °C por 96 horas. Decorrido esse tempo, foram moídas em moinho de facas (Wiley®) com peneira para obtenção de partículas não maiores que 1 mm, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a 4 °C até o momento de uso.

3.1.2. Pré-tratamento ácido das biomassas

As biomassas secas e moídas foram tratadas com solução de ácido sulfúrico 0,1 M (1%, m/v), em frascos de 125 mL contendo 5g de biomassa e 50 mL de solução ácida, e submetidas a uma temperatura de 121 °C em autoclave por 30 minutos.

Após o tratamento, as misturas foram filtradas a vácuo, em funil de Büchner, utilizando papel de filtro qualitativo, realizando lavagens com água destilada aquecida na proporção de 50 mL/g. Os filtrados foram coletados e armazenados a -5 °C para posteriores análises.

3.1.3. Pré-tratamento sem ácido

Para realização do pré-tratamento sem ácido, 5 g das biomassas foram adicionadas a frascos de 125 mL contendo 50 mL de água destilada. Os frascos com as amostras foram submetidos a temperatura de 121 °C em autoclave por 30 minutos, filtradas e lavadas conforme descrito anteriormente. Essas biomassas foram utilizadas para as etapas de hidrólise enzimática, paralelamente as biomassas pré-tratadas.

3.1.4. Avaliação da perda de massa

Para avaliação da perda de massa das amostras, 1 g de cada amostra submetida ao pré-tratamento foi filtrada em papéis de filtro previamente pesados. Os papeis de filtro com os resíduos secos em estufa a 65 °C foram transferidos para dessecador e posteriormente tiveram suas massas aferidas até peso constante após três pesagens consecutivas.

3.1.5. Caracterização das matérias-primas

As matérias-primas secas e moídas, assim como as amostras submetidas ao procedimento de pré-tratamento caracterizadas quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina, empregando-se o método de Van Soest (1991) o qual se baseia na determinação dos teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina.

Para a determinação dos teores de fibra em detergente neutro, foram adicionados 100 mL de solução detergente neutro e 50 µL de amilase, estável ao calor em 1 g de amostra, os quais foram incubados em aparelho digestor. Foi feito o aquecimento até ebulição por cinco minutos. Após esse período, a temperatura foi ajustada para o refluxo da amostra e mantida por 60 minutos. As amostras foram filtradas sob vácuo em cadinhos filtrantes previamente secos a 105 °C, lavadas com água fervente, filtradas sob vácuo e secas em estufa por oito horas a 100 °C. Após este período suas massas foram mensuradas.

A determinação do teor de fibras em detergente ácido procedeu adicionando 1,0 g de amostra em 100 mL de solução detergente ácido. A mistura foi mantida em ebulição por 5 minutos um aparelho digestor. Em seguida a temperatura foi ajustada para o refluxo da amostra onde permaneceu por 60 minutos. As amostras foram filtradas sob vácuo em cadinho filtrante previamente seco a 105 °C. Durante a filtração foi realizadas duas lavagens com água fervente e duas com 40 mL de acetona. Após as lavagens as amostras foram filtradas sob vácuo e secas em estufa por oito horas a 100 °C e tiveram suas massas mensuradas.

Para determinar o teor de lignina adicionou-se 30 mL de H₂SO₄ 72% (15 °C) aos resíduos resultantes da determinação de fibra em detergente ácido os quais foram mantidos por um tempo reacional de uma hora. As amostras foram, então, filtrados sob vácuo e lavadas com água fervente. Os resíduos foram secos em estufa por oito horas a 100°C e tiveram suas massas mensuradas.

Os cadinhos foram colocados em mufla a 500 °C, onde permaneceram por três horas e transferidos para estufa a 105 °C. Decorridos 30 minutos, estes foram resfriados em dessecador e tiveram suas massas mensuradas.

O cálculo do teor de lignina foi obtido pela perda de massa após a queima na mufla

Os teores de celulose foram estimados pela diferença entre o teor de fibras em detergente ácido e os teores de lignina e cinzas. Já os teores de hemicelulose foram determinados pela diferença entre fibras em detergente neutro (FDN) e fibras em detergente ácido (FDA).

3.1.6. Parâmetros de avaliação dos efeitos do pré-tratamento

Os efeitos do pré-tratamento sobre as biomassas na composição química (celulose, hemicelulose e lignina) das amostras de capim-andropogon, capim-elefante, capim-mombaça e bagaço de cana-de-açúcar foram avaliados, assim como a perda de massa foi utilizada para estimativa de produção de etanol.

Os percentuais de remoção de hemicelulose pelo pré-tratamento ácido foram calculados pela seguinte fórmula:

$$\% \text{Remoção} = \frac{Hi - Ha}{Hi} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

onde Hi é o teor de hemicelulose da amostra sem tratamento e Ha o teor de hemicelulose na amostra pré-tratada com ácido.

3.1.7 Perfil de hidrólise enzimática das biomassas

As biomassas previamente pré-tratadas foram hidrolisadas por um complexo de celulasas liofilizado, Powercell®, fornecido pela empresa Prozyn, com a atividade enzimática declarada de 200 FPU/g (*Filter paper units*) e estocada a 5 °C. Essas enzimas foram caracterizadas quanto à atividade enzimática total, para assegurar a coerência com o valor declarado, a qual foi confirmada experimentalmente (205 FPU/g) pelo método descrito por Ghose (1987) o qual baseia-se na hidrólise enzimática de tiras de papel Whatman n°1 (1 cm x 6 cm) por 60 minutos, a 60 °C, pH 4,8, seguida de quantificação dos

açúcares redutores gerados na reação. Os resultados são expressos em unidades de filtro de papel por grama de enzima.

3.1.7.1 Hidrólise enzimática de 72 horas

Para a hidrólise das biomassas, a concentração de enzima empregada foi de 0,10 g/g de biomassa, que corresponde a aproximadamente 20 FPU (*Filter Paper Units*) sob concentração de sólidos lignocelulósicos de 10 % (5 g de biomassa para 50 mL de solução), pH 5,0, temperatura de 60 °C, agitação a 150 rpm. Para isso, as amostras foram ressuspensas em 45 mL de água destilada e tiveram o pH ajustado para 5,0 com soluções de HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M. Volume de 5 mL de tampão citrato de sódio (0,05 M) pH 5,0 foi adicionado aos frascos com o objetivo de manter o pH ótimo de atividade enzimática durante a hidrólise.

O processo de hidrólise enzimática foi conduzido por 72 horas e alíquotas de 1,5 mL de cada amostra foram coletadas nos tempos de 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 horas e armazenadas a -5 °C para a avaliação posterior da concentração de açúcares redutores pelo método de Miller (1959). Este método baseia-se na reação de oxi-redução de açúcares redutores com o ácido-3,5-dinitrosalicílico, gerando solução de cor entre amarelo e marrom, seguida de leitura de absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. Para o cálculo da concentração de açúcares redutores, foi construída uma curva analítica com cinco concentrações de glicose e seus respectivos valores de absorbância. Para a quantificação desses açúcares as amostras foram descongeladas, aquecidas por 2 minutos a 80 °C para a inativação das enzimas e centrifugadas por 10 minutos a 2133 x g para a separação do líquido da fração sólida. Tal procedimento teve como objetivo a construção das curvas de concentração de açúcares redutores em função do tempo de hidrólise para elucidar o perfil hidrolítico das amostras e assim, determinar o tempo de pré-hidrólise para a etapa posterior de sacarificação e fermentação simultâneas.

3.1.7.2 Determinação da composição dos hidrolisados enzimáticos

Além da quantificação dos açúcares redutores, determinou-se, também, a composição de açúcares dos hidrolisados no tempo de 24 horas. Nestes hidrolisados, foram quantificados os teores de glicose, xilose, arabinose, manose e galactose por cromatografia iônica, sendo esta análise realizada no Laboratório de Papel e Celulose da Universidade Federal de Viçosa.

Para isso, os sobrenadantes dos tratamentos foram filtrados em filtros de 0,22 μm . O filtrado foi analisado de acordo com a metodologia descrita por Wallis *et al.* (1996) em Cromatógrafo Iônico (IC-3000 Dionex) com um detector amperométrico pulsado (HPAE-PAD). A separação de açúcares foi conseguida utilizando uma coluna de proteção e uma coluna analítica Carbo-Pac PA1 conectadas em série. Utilizou-se água como eluente a uma taxa de 1,0 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida a 28 °C.

A hidrólise enzimática foi avaliada pelo teor de açúcares redutores no hidrolisado ao longo de 72 horas e composição de açúcares do hidrolisado no tempo de 24 horas. As médias das concentrações de açúcares redutores foram analisadas por ANOVA e comparadas pelo teste de Tukey a 5 %.

3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1. Caracterização das amostras

As matérias-primas apresentaram percentuais de hemicelulose e lignina próximos entre si (Tabela 4). Quanto aos teores de celulose, o bagaço de cana-de-açúcar apresentou o maior teor, 41,2 % e o capim-andropogon o menor teor, 32,9 %.

Tabela 4. Composição química parcial das matérias-primas, expressos em porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina.

Amostra	Pré-tratamento	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Capim-andropógon	Sem tratamento	32,9	31,7	9,3
	Sem ácido	37,5	35,9	10
	Ácido	54,2	3,6	17,1
Bagaço de cana	Sem tratamento	41,2	32,5	10,4
	Sem ácido	43,8	31,1	9,6
	Ácido	59,2	3,5	15,6
Capim-elefante	Sem tratamento	37	27,8	8,4
	Sem ácido	44,2	34	8
	Ácido	53,8	8,8	15,4
Capim-mombaça	Sem tratamento	35,6	29,4	8,7
	Sem ácido	41,2	33,2	10,4
	Ácido	54,1	12,8	12,2

O teores de celulose e hemicelulose das matérias-primas avaliadas não se distanciam dos valores relatados por Saha e Cotta, (2006), Saha, (2003) para bagaço de cana-de-açúcar e por Rodrigues *et al* (2004) em caracterização de *Andropogon gayanus* e *Panicum maximum*. Já os teores de lignina do capim-andropogon, capim-elefante e capim-mombaça foram superiores aos 5% relatados pelos mesmos autores, enquanto que o teor de lignina do bagaço de cana-de-açúcar distanciou-se consideravelmente aos 25% relatados pelos mesmos autores. Por outro lado, Benjamin, Cheng, e Görgens (2013) avaliaram a composição do bagaço de cana-de-açúcar de diferentes variedades e encontraram valores de lignina que variaram de 14,4 a 23,1 %. As diferenças nos teores de lignina podem ser decorrentes do emprego de

diferentes métodos de determinação desses compostos. A presença de elevados teores de lignina faz com que parede celular vegetal torne-se mais recalcitrante, dificultando o acesso das enzimas ao substrato.

O pré-tratamento ácido foi efetivo na remoção da fração hemicelulósica das amostras, resultando em biomassas com baixos teores de hemicelulose. Avaliando a composição centesimal das amostras sem pré-tratamento e após o pré-tratamento ácido (tabela 4), calcula-se que houve a remoção de 88% da hemicelulose do capim-andropogon, 89 % do bagaço de cana-de-açúcar, 68 % capim-elefante e 56 % do capim-mombaça (figura 10). A diferença observada nos percentuais de remoção pode ser devido a existência da diferentes graus de interação entre os constituintes celulose, hemicelulose e lignina tornando-os mais resistentes aos efeitos do ácido.

Na figura 10 são evidenciados os percentuais de remoção de hemicelulose após o pré-tratamento com solução de H_2SO_4 diluído.

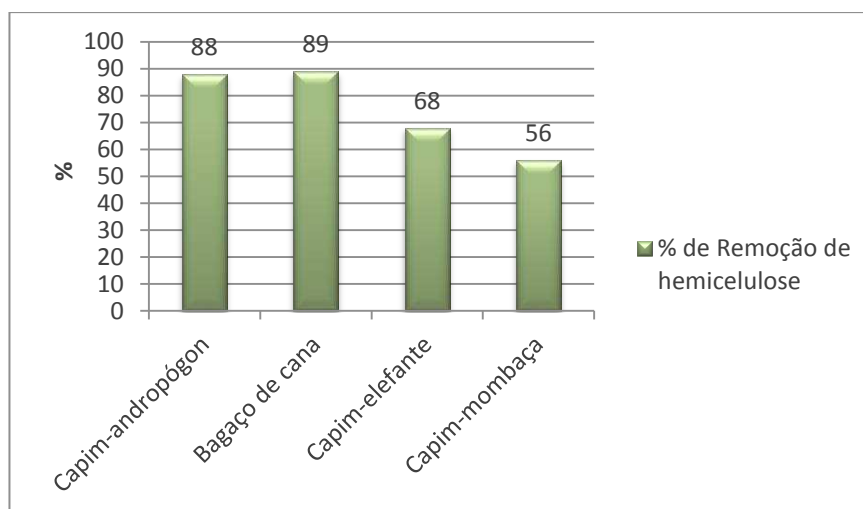


Figura 10. Representação dos percentuais de remoção de hemicelulose do capim-andropogon, bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante e capim-mombaça resultante do pré-tratamento ácido.

Os teores de celulose e hemicelulose da biomassa de bagaço de cana-de-açúcar foram semelhantes aos relatados por Candido, Godoy e Gonçalves (2012), em estudo de avaliação do pré-tratamento com ácido sulfúrico 10%, a 100 °C por 30 minutos de bagaço de cana-de-açúcar, no qual resultou biomassa com teores de 54,0 % de celulose e de 12,7% de hemicelulose. A aproximação dos valores do presente estudo com aqueles dos referidos

autores, mesmo em condições mais brandas (H_2SO_4 2%), enfatizam a efetividade pré-tratamento selecionado para a remoção da hemicelulose das biomassas em estudo.

3.2.2 Avaliação do perfil de hidrólise enzimática das biomassas

3.2.2.1 Quantificação dos açúcares redutores

Todas as amostras estudadas apresentaram perfis de hidrólise semelhantes, os quais foram independentes do pré-tratamento. A semelhança dos perfis de hidrólise dos capins ao bagaço de cana-de-açúcar indica que a utilização destes como fonte de substrato para hidrólise enzimática, do ponto de vista bioquímico, é viável.

Já velocidade de conversão de biomassa em açúcares redutores foi visivelmente maior nas primeiras 24 horas, mantendo-se estável a partir deste tempo.

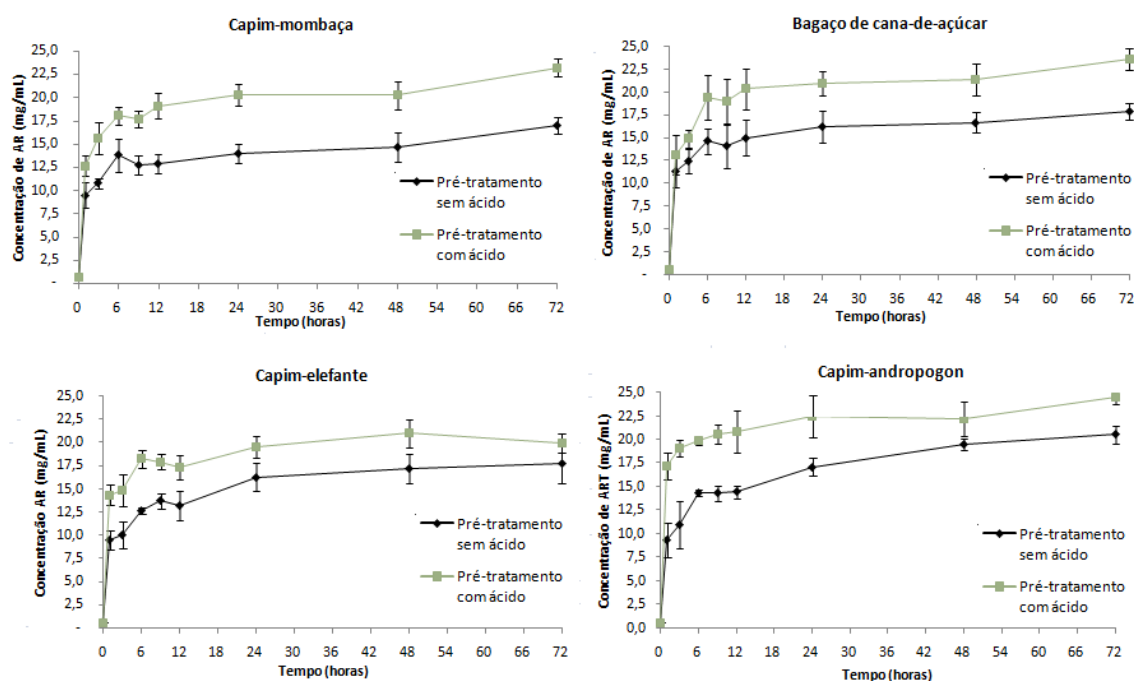


Figura 11. Perfis de hidrólise enzimática, expressas em concentração de açúcares redutores (AR), mg/mL, em função do tempo, das biomassas pré-tratadas com ácido e sem ácido.

Tabela 5. Comparação de médias das concentrações de AR, em mg/mL, entre os tempos de hidrólise de 24, 48 e 72 horas, por tipo de amostra

Tempo (horas)	Amostras			
	Capim-andropogon	Bagaço	Capim-elefante	Capim-mombaça
72	24,61 a	23,61 a	20,11 a	23,17 a
48	22,22 a	21,44 a	21,00 a	20,33 b
24	22,49 a	21,05 a	19,56 a	20,3 b

Valores seguidos das mesmas letras entre as linhas, nas mesmas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Dos valores apresentados, somente o valor médio 23,17 mg/mL, no tempo de 72 horas do capim-mombaça, diferiu significativamente daqueles obtidos nos tempos de 48 e 24 horas. Nessas condições, o emprego de tempos mais curtos pode significar redução de custos e maior produtividade.

Considerando-se que não houve diferença significativa entre os tempos de 24 e 48 horas, o tempo de 24 horas, nessas condições, foi considerado suficiente para obter concentrações de açúcares redutores relativamente altas no menor tempo reacional. Diante disso, fixou-se 24 horas como tempo de pré-hidrólise para o posterior processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF).

3.2.2.2 Avaliação da composição dos hidrolisados no tempo de 24 horas

Para avaliar de maneira mais específica a composição dos hidrolisados no tempo selecionado de pré-hidrólise, 24 horas, amostras coletadas neste tempo foram submetidas à cromatografia de troca aniônica (tabela 8).

Considerando a soma dos monossacarídeos mensurados presentes no hidrolisado das amostras, foram observados teores de até 84 % em relação ao total, enquanto que nas amostras pré-tratadas sem ácido, teores de aproximadamente 69 % foram detectados. Os valores mensurados nos hidrolisados das amostras pré-tratadas com ácido foram semelhantes entre si, exceto para o capim-andropogon que apresentou teor de glicose de 80,50%, inferior aos demais.

A alta concentração de glicose nos hidrolisados é desejável para o processo desenvolvido nesse estudo, uma vez que o micro-organismo empregado na etapa de fermentação não assimila as pentoses.

Tabela 6. Identificação da composição centesimal dos monossacarídeos constituintes dos hidrolisados do tempo de 24 horas por Cromatografia de troca iônica

Amostra	Pré-tratamento	Glicose (%)	Xilose (%)	Galactose(%)	Manose(%)	Arabinose(%)
Bagaço de cana	Ácido	82,99	10,93	2,80	0,35	2,94
	Sem ácido	67,11	22,47	5,64	0,43	4,35
Capim-andropogon	Ácido	80,50	15,01	3,29	0,42	0,78
	Sem ácido	68,77	19,64	6,34	0,37	4,89
Capim-elefante	Ácido	84,82	11,19	3,13	0,32	0,53
	Sem ácido	67,54	17,49	5,88	0,37	8,71
Capim-mombaça	Ácido	83,98	11,47	3,55	0,30	0,69
	Sem ácido	66,96	17,75	6,57	0,49	8,23

Os valores correspondem às porcentagens que cada monossacarídeo representa em relação ao total presente no hidrolisado.

Entretanto, tais pentoses podem ser assimiladas por outros micro-organismos, enfatizando assim sua impotência. O menor teor de xilose dentre as biomassas hidrolisadas, pré-tratadas com ácido, foi de 10,93 % para o bagaço de cana-de-açúcar. Já o maior corresponde ao observado no hidrolisado da amostra de capim-andropogon, apresentando 15,01 %. Os valores de xilose das amostras pré-tratadas sem ácido foram superiores às pré-tratadas com ácido. Tal fato decorre dos maiores percentuais de hemicelulose presentes naquelas amostras pré-tratadas sem ácido conforme observado anteriormente.

Já os monossacarídeos galactose, manose e arabinose, juntos representaram valores aproximados 4 % a 6 % e de 10 a 15 %, nos hidrolisados das amostras pré-tratadas e pré-tratadas sem ácido, respectivamente.

4. CAPÍTULO 2 – PRÉ-HIDRÓLISE, FERMENTAÇÃO E SACARIFICAÇÃO SIMULTÂNEAS (SSF) DAS BIOMASSAS

Na fermentação de etanol por vias fermentativas, o acoplamento de duas etapas, por meio da sacarificação e fermentação simultâneas tem demonstrado maiores rendimentos em etanol quando comparados aos processos em etapas separadas (SANCHEZ E CARDONA, 2008). Adicionalmente, pesquisadores têm relatado a importância da realização da etapa de pré-hidrólise, a qual precede o início do processo de sacarificação e fermentação, devido à reduzida disponibilidade de fontes de carbono no meio reacional. Dos Santos, Souto-Maior e Gouveia (2010) e Silva (2010), por exemplo, obtiveram maiores produtividades volumétricas em etanol em processo de SSF quando aplicada a pré-hidrólise da biomassa por um período de 16 horas, garantindo consumo de glicose e produção de etanol mais eficientes.

Esta etapa teve como objetivo avaliar a produção de etanol a partir das biomassas de capim-andropogon, capim-elefante, capim-mombaça e bagaço de cana-de-açúcar previamente pré-tratadas, empregando a condição de pré-hidrólise selecionada anteriormente e o processo de sacarificação e fermentação simultâneas conduzido pela linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* LBM-1, cedida pelo Laboratório de Biotecnologia Molecular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV, a qual apresentou rendimentos de fermentação ótimos a 37 °C , em estudos anteriores por Souza *et al* (2013).

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.2 Pré-hidrólise e Sacarificação e Fermentação Simultâneas

4.1.2.1 Preparo de inóculo

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* foi mantida em meio YPD sólido (2 % extrato de levedura, 1% peptona, 2% glicose e 2% Agar) a 5 °C. A ativação

foi realizada em tubos de 20 mL contendo 10 mL de meio de cultura composto por extrato de levedura (2,5 g/L), peptona (2,5 g/L), os sais suplementares NH_4Cl (2,0 g/L), KH_2PO_4 (1,0 g/L), MgSO_4 (0,3 g/L) e glicose 1%. Foi adicionada em cada tubo uma colônia da levedura e estas foram incubadas em agitador rotatório a 180 rpm, a 37 °C por 24 horas. Decorridas 24 horas de incubação, o conteúdo dos tubos foram transferidos para frascos de 250 mL contendo 90 mL do meio mais 1,5 % de glicose. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 180 rpm, a 37 °C por 24 horas. Esta etapa, denominada de pré-inóculo, teve por objetivo a adaptação das leveduras e produção de biomassa celular.

Para o preparo do inóculo, o conteúdo do pré-inóculo foi centrifugado a 2000 x g por 10 minutos em frascos cilíndricos de volume de 100 mL e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em solução salina de NaCl, (0,85 %, m/v) e centrifugadas sob as mesmas condições citadas anteriormente e o sobrenadante descartado. A massa úmida de células foi utilizada como inóculo no processo de sacarificação e fermentação simultâneas descrito a seguir.

4.1.2.2 Pré-hidrólise e Sacarificação e Fermentação Simultâneas

Amostras de capim-andropogon, capim-elefante, capim-mombaça e bagaço de cana-de-açúcar foram pré-tratadas com ácido sulfúrico (capítulo 1), filtradas, secas e hidrolisadas por um período de 24 horas numa proporção de biomassa e solução aquosa 1:10, concentração enzimática equivalente a 20 FPU/g, a 60 °C sob agitação a 150 rpm (capítulo 1).

Decorridas as 24 horas de pré-hidrólise a 60 °C, retirou-se os frascos do agitador e coletou-se alíquotas do sobrenadante as quais foram mantidas a -5 °C para a quantificação de açúcares redutores. Adicionou-se 0,25 g (massa úmida) de leveduras, atingindo concentração de 5 g/L, e os sais suplementares sob as mesmas concentrações empregadas no preparo de inóculo. Os fermentômetros, dispositivos que isolam o ambiente interno do externo, permitindo somente a saída de CO_2 , foram acoplados aos frascos que foram

incubados novamente em agitador rotatório sob a 150 rpm, a temperatura de 37 °C por 48 horas.

As amostras fermentadas, previamente filtradas, foram destiladas em balão de 50 mL. Um aparato para destilação composto por uma manta aquecedora e um condensador de liebig, tipo liso de 40 cm de comprimento, foi utilizado. Para a realização deste procedimento, uma adaptação da metodologia descrita pelo Instituto Adolf Lutz (2005) para determinação do teor alcoólico de bebidas fermentadas foi utilizada. De acordo com tal método, as amostras foram destiladas até o volume de destilado completar 3/4 do volume inicial contido no balão. O destilado teve o volume completado para o volume inicial da amostra com água destilada e foi acondicionado a 5 °C para a determinação do teor alcoólico por cromatografia gasosa, empregando uma adaptação de um método para análise de compostos voláteis de destilados alcoólicos desenvolvido por Pereira (2007).

Nesse processo, utilizou-se Cromatógrafo a gás CG-17 A modelo Shimadzu QP5050, com detector de ionização em chama (FID), coluna capilar de sílica fundida PAG de caráter muito polar (30 m de comprimento x 0,25 mm de espessura do filme x 0,25 µm de diâmetro interno). Utilizou-se hélio como gás de arraste, ar sintético como gás de ignição e manutenção da chama e o gás hidrogênio pela chama do detector, todos com grau de pureza 99,999 %. Para a injeção utilizou-se uma seringa de 10 µL.

A programação do cromatógrafo seguiu de acordo com as seguintes condições:

- ❖ Temperatura da coluna: inicial de 35 °C por 10 minutos, com elevação da temperatura em uma taxa de 10 °C por minuto até 120 °C, na qual permaneceu por 10 minutos.
- ❖ Temperatura do injetor: 180 °C
- ❖ Temperatura do detector: 200 °C
- ❖ Vazão do gás de arraste (He): 1 mL/min
- ❖ Vazão da chama (H₂): 20 mL/min
- ❖ Vazão do ar sintético: 175 mL/min
- ❖ Razão de divisão (split): 1:2

A solução padrão de etanol foi preparada a partir de um padrão de etanol 95 %. Mediu-se a densidade do mesmo, e a partir deste, foi preparada uma solução a 1,3 % (v/v). Partindo dessa solução estoque 1,3 % (v/v), preparou-se 4 soluções com as seguintes concentrações: 0,0 %, 0,13 %, 0,26 %, 0,39% e 0,52 % (v/v). Essas soluções foram injetadas obtendo-se uma equação de uma curva analítica com coeficiente de correlação de 0,998.

Injetou-se 1µL das amostras destiladas, sendo o pico correspondente ao etanol identificado de acordo com o tempo de retenção do etanol obtido durante as corridas para construção da curva analítica.

Os parâmetros para a avaliação dos resultados desta etapa, a qual envolveu a pré-hidrólise e a sacarificação e fermentação simultâneas, foram as concentrações de glicose estimadas no tempo de 24 horas de pré-hidrólise, as concentrações de etanol no tempo final de fermentação, os rendimentos (m/m) de glicose por biomassa ($Y_{G/B}$), de glicose por celulose ($Y_{G/C}$), de etanol por biomassa ($Y_{E/B}$) e de etanol por glicose ($Y_{E/G}$). Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação de médias Tukey a 5 % de probabilidade entre as diferentes biomassas pré-tratadas com ácido.

As concentrações de glicose da pré-hidrólise foram estimadas utilizando os dados da composição centesimal dos hidrolisados no tempo de 24 horas da etapa de avaliação do perfil hidrolítico (tabela 7) e os teores de açúcares redutores (AR) foram mensurados ao término da pré-hidrólise, conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Teor de glicose (g/L)} = \frac{\% \text{Glicose}}{100} \times [AR] \quad (\text{Eq. 2})$$

Os teores de etanol no tempo final de fermentação obtidos por análise cromatográfica estão expressos em gramas por litro.

Para os calulos de rendimento, foram usadas as seguintes equações:

$$Y_{G/B} = \frac{[glicose]}{[sólidos]} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$Y_{G/C} = \frac{[glicose]}{[sólidos]} \times \frac{\% \text{ celulose}}{100} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$Y_{E/B} = \frac{[etanol]}{[sólidos]} \quad (\text{Eq. 5})$$

$$Y_{E/G} = \frac{[etanol]}{[glicose]} \quad (\text{Eq. 4})$$

Sendo, $Y_{G/B}$ = rendimento de glicose por grama de biomassa (g/g); $Y_{G/C}$ = rendimento de glicose por grama de celulose (g/g); $Y_{E/B}$ = rendimento de etanol por grama de biomassa (g/g); $Y_{E/G}$ = rendimento de etanol por grama de glucose (g/g); [glicose] = concentração de glicose estimada, expressa em g/L; [sólidos] = proporção de biomassa e a fração líquida empregada na hidrólise enzimática de 100 g/L (1:10); [etanol] = concentração final de etanol mensurada, expressa em g/L; % celulose = porcentagem de celulose da biomassa pré-tratada.

4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1. Avaliação da pré-hidrólise do processo de SSF

Ao término das 24 horas de pré-hidrólise, foram quantificados os açúcares redutores dos hidrolisados para estimativas das concentrações de glicose (tabela 9). Com base nestas, foram calculados os rendimentos.

Avaliando as concentrações de glicose estimadas da pré-hidrólise, obteve-se diferença significativa entre as amostras que foram pré-tratadas com ácido e sem ácido, como esperado. Já o bagaço de cana-de-açúcar apresentou concentração de glicose maior que os obtidos pelas amostras de capim-mombaça e capim-andropogon pré-tratadas.

Os rendimentos de glicose por grama de biomassa ($Y_{G/B}$) das amostras de capim-androgon, capim-elefante e capim-mombaça foram superiores aos alcançados por Sun e Cheng (2005) que obtiveram aproximadamente 0,142 g de glicose por grama de biomassa em estudo no qual foi avaliada hidrólise enzimática de grama bermuda, sob condições semelhantes de pré-tratamento em relação ao presente trabalho, hidrólise enzimática por 48 horas e carga enzimática de 25FPU/g de biomassa, representando assim como bons

candidatos ao processo de hidrólise enzimática nas condições empregadas no presente estudo.

Quanto aos resultados de rendimentos de conversão de celulose em glicose ($Y_{G/C}$), não houve diferença significativa entre os produtos da pré-hidrólise de amostras pré-tratadas com ácido e sem ácido, por tipo de biomassa. Esperar-se-ia que as amostras que sofreram pré-tratamento ácido, por terem a maior parte da hemicelulose removida (capítulo 2) apresentariam menor bloqueio ao acesso das enzimas à celulose e, conseqüentemente, maior taxa de conversão do que aquelas as amostras sem ácido, nas quais a remoção de hemicelulose é mínima.

É possível que as diferenças das concentrações de glicose entre as amostras pré-tratadas com ácido e sem ácido, por tipo de biomassa, tenham ocorrido, principalmente, devido aos diferentes percentuais de celulose na composição dessas biomassas, uma vez que as amostras pré-tratadas com ácido apresentaram teores de celulose superiores as pré-tratadas sem ácido, havendo, dessa forma, maior quantidade e disponibilidade de substrato para a reação enzimática. O bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo, apresentou um teor de celulose de 59,2 % nas amostras pré-tratadas com ácido enquanto que nas amostras sem ácido teor foi de 43,8 %.

A alta cristalinidade da celulose é outro fator que pode influenciar nos rendimentos de hidrólise enzimática das biomassas. Samuel *et al* (2010) avaliou os efeitos do pré-tratamento com ácido sulfúrico sob a biomassa de *Swichgrass* e comparou os resultados aos obtidos das biomassas não pré-tratadas. Nesse estudo, apesar do pré-tratamento ácido ter removido a hemicelulose quase por completo, o ácido não reduziu a cristalinidade da celulose. De forma análoga, o mesmo pode ter ocorrido no presente trabalho, justificando, neste caso, a ausência de diferença significativa dos rendimentos de conversão de celulose em glicose ($Y_{G/C}$) entre amostras pré-tratadas com ácido e sem ácido.

Tabela 7. Avaliação das concentrações de glicose e rendimentos da pré-hidrólise das amostras de capim-andropogon, bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante e capim-mombaça pré-tratadas.

Amostra	Pré-tratamento	Glicose* (g/L)	Celulose [‡] (%)	Y _{G/B} (g/g)	Y _{G/C} (g/g)
Capim-andropogon	Sem ácido	12,00 ± 0,48	37,5	0,12	0,32
	Ácido	15,27 ± 1,34	54,2	0,15	0,28
Bagaço de cana	Sem ácido	11,71 ± 0,05	37,5	0,12	0,27
	Ácido	17,85 ± 0,55	54,1	0,18	0,30
Capim-elefante	Sem ácido	11,66 ± 1,54	44,2	0,12	0,26
	Ácido	16,58 ± 0,11	53,8	0,17	0,31
Capim-mombaça	Sem ácido	12,27 ± 0,19	41,2	0,12	0,30
	Ácido	15,39 ± 1,85	54,1	0,15	0,28

Rendimentos de glicose por grama de biomassa (Y_{G/B}), glicose por grama de celulose (Y_{G/C}). Os cálculos de Y_{G/B} basearam-se na concentração de sólidos de 100g/L no meio reacional e os de Y_{G/C} nos respectivos teores de celulose de cada biomassa.

* Valores de glicose estimados, resultantes de três repetições experimentais.

[‡] Percentuais de celulose presentes nas respectivas biomassas.

Em relação à análise das biomassas pré-tratadas com ácido, não houve diferença significativa para Y_{G/C}. Dessa forma, as diferenças nos percentuais de remoção de hemicelulose, discutidos anteriormente, decorrentes do pré-tratamento ácido parecem não ter influenciado em grande magnitude na recalcitrância das matérias-primas.

Diversos autores têm atribuído a recalcitrância da biomassa, principalmente, à cristalinidade, ao grau de polimerização e à baixa acessibilidade das enzimas celulolíticas ao substrato devido à proteção da celulose pela lignina e hemicelulose (CHENG, NAGWANI E HOLTZAPPLE, 1998; ZHANG E LYND, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; HONG, ZHANG E LANGMUIR, 2007). A relação entre esses fatores estruturais reflete a complexidade da recalcitrância da biomassa lignocelulósica.

Considerando que a diferença nos percentuais de remoção de hemicelulose entre as diferentes matérias-primas não tenha aparentemente influenciado nos rendimentos de conversão de celulose em glicose (Y_{G/C}), e que os teores de lignina foram semelhantes, estudos estruturais relacionados aos efeitos do pré-tratamento ácido sobre a cristalinidade do capim-andropogon, capim-elefante, capim-mombaça e do bagaço de cana-de-açúcar

podem contribuir para maiores esclarecimentos a respeito de tal comportamento observado.

4.2.2. Avaliação da Sacarificação e Fermentação Simultâneas

Os resultados dos rendimentos de etanol por grama de glicose ($Y_{E/G}$) da sacarificação e fermentação simultâneas apresentaram valores que não diferiram significativamente entre si, tanto para os diferentes tipos de biomassa submetidos ao mesmo pré-tratamento, quanto entre as que foram submetidas aos pré-tratamentos, para a mesma biomassa (tabela 11).

Os rendimentos $Y_{E/G}$ apresentaram valores superiores ao valor teórico de 0,51 g de etanol por grama de glicose. Isso decorre do de os cálculos terem sido baseados nas concentrações de glicose obtidas ao final da pré-hidrólise nos cálculos. Assim, a glicose oriunda da hidrólise que ocorreu simultaneamente ao processo de SSF e que foi convertida em etanol, não pode ser contabilizada. Com base nos valores desses rendimentos, pode-se afirmar que o emprego do processo de SSF aumentou consideravelmente a quantidade de glicose disponível no meio reacional para a fermentação baseando-se nas concentrações de etanol obtidas ao final do processo. Considerando somente os teores de glicose estimados do tempo de 24 horas das amostras pré-tratadas com ácido e o rendimento teórico de 0,51g de etanol por grama de glicose, obter-se-iam para o capim-andropógon, bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante e capim-mombaça, as concentrações de etanol finais de 7,8 g/L, 9,1 g/L, 8,5 g/L e 7,8 g/L respectivamente. Diante das concentrações finais de etanol, observa-se que a hidrólise enzimática, durante o período de 48 horas de SSF, foi satisfatória, mesmo em uma temperatura consideravelmente abaixo daquela considerada ótima para as celulasas.

Tabela 8. Concentrações de etanol, rendimentos por grama de biomassa e glicose obtidos da pré-hidrólise e sacarificação e fermentação simultâneas das amostras.

Amostra	Tratamento	Glicose* (g/L)	EtOH (g/L)	$Y_{E/B}$ (g/g)	$Y_{E/G}$ (g/g)
Capim-andropogon	Sem ácido	12,00 ± 0,48	9,26 ± 0,94	0,09	0,77
	Ácido	15,27 ± 1,34	15,17 ± 0,44	0,15	0,99
Bagaço de cana	Sem ácido	11,71 ± 0,05	7,40 ± 1,31	0,07	0,63
	Ácido	17,85 ± 0,55	13,49 ± 0,47	0,14	0,76
Capim-elefante	Sem ácido	11,66 ± 1,54	9,14 ± 1,12	0,09	0,78
	Ácido	16,58 ± 0,11	13,58 ± 1,73	0,14	0,82
Capim-mombaça	Sem ácido	12,27 ± 0,19	7,21 ± 1,8	0,07	0,59
	Ácido	15,39 ± 1,85	12,47 ± 1,13	0,13	0,81

Valores resultantes de três repetições experimentais

Rendimentos de etanol por grama de biomassa ($Y_{E/B}$) e etanol por grama de glicose ($Y_{E/G}$).

* Valores de glicose estimados da pré-hidrólise

Os rendimentos de etanol obtidos por grama de biomassa ($Y_{E/B}$) das forrageiras testadas neste estudo apresentaram valores próximos aos alcançados por Anderson *et al.* (2008), em trabalho no qual foram utilizadas cana-do-reino (*Arundo donax*), grama bermuda e capim tifton 85 (*Cynodon* sp.) assim como capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) sob pré-tratamento ácido e sacarificação e fermentação simultâneas, mesmo sob condições mais brandas de pré-tratamento e adição de cebiasas. Entretanto, tais autores empregaram concentrações inferiores de celulasas, indicando que a possibilidade de bons rendimentos empregando baixas concentrações de enzima. De fato, o alto custo das enzimas, atualmente, é um importante fator a ser considerado. O fator financeiro do processo é um item relevante que não pode ser excluído durante o desenvolvimento de um projeto de produção de etanol de segunda geração em escala industrial.

Suryawati *et al.* (2008) avaliou a produção de etanol utilizando *switchgrass* (*Panicum virgatum*) como matéria-prima, obtendo rendimento de 0,19 g de etanol por grama de biomassa (Tabela 12). Tal valor pode ser decorrente de vários fatores como a recalcitrância da matéria-prima utilizada, desempenho do complexo de enzimas e leveduras e o processo de hidrotermólise a 200 °C.

Vale ressaltar que os estudos relacionados à produção de etanol de segunda geração envolvem ampla variedade de condições o que dificulta a realização de comparações diretas de rendimentos, tanto no que se refere aos tipos de matéria-prima, quanto aos mecanismos de pré-tratamento, hidrólise e fermentação.

A proximidade entre os rendimentos de etanol por grama de biomassa das diferentes matérias primas nos estudos (tabela 12), indica que o uso de capim-elefante, capim-mombaça e capim-andropógon são boas alternativas para a produção de etanol.

Tabela 9. Rendimentos em etanol para diferentes fontes de biomassa via processo de sacarificação e fermentação simultâneas conduzidos por outros autores, comparativamente aos obtidos neste trabalho.

Biomassa	Pré-tratamento	Hidrólise	Concentração de etanol (g/L)	$Y_{E/B}$ (g/g)	Fonte
<i>Cynodon</i> sp. (Tifton 85)	H ₂ SO ₄ , 121 °C 1,5%, 60 min	5 FPU/g celulases 12 U celobiase/g	-	0,14	Anderson <i>et al.</i> , 2008
<i>Cynodon</i> sp. (Coastal)	H ₂ SO ₄ , 121 °C 1,5%, 60 min	5 FPU/g celulases 12 U celobiase/g	-	0,12	Anderson <i>et al.</i> , 2008
<i>Arundo donax</i> (Cicily)	H ₂ SO ₄ , 121 °C 1,5%, 60 min	5 FPU/g celulases 12 U celobiase/g	-	0,1	Anderson <i>et al.</i> , 2008
<i>Pennisetum purpureum</i> (Merkeron)	H ₂ SO ₄ , 121 °C 1,5%, 60 min	5 FPU/g celulases 12 U celobiase/g	-	0,11	Anderson <i>et al.</i> , 2008
<i>Panicum virgatum</i>	Hidrotermólise 200 °C	15 FPU/g celulases	14	0,19	Suryawati <i>et al.</i> , 2008
<i>Andropogon gayanus</i>	H ₂ SO ₄ , 121 °C 1%, 30 min	20 FPU/g celulases	15,2	0,15	*
<i>Pennisetum purpureum</i>	H ₂ SO ₄ , 121 °C 1%, 30 min	20 FPU/g celulases	13,6	0,14	*
<i>Panicum maximum</i> (Mombaça)	H ₂ SO ₄ , 121 °C 1%, 30 min	20 FPU/g celulases	12,5	0,13	*
Bagaço de cana	H ₂ SO ₄ , 121 °C 1%, 30 min	20 FPU/g celulases	13,4	0,14	*

* Valores obtidos neste trabalho.

5. CAPÍTULO 3 – ESTIMATIVAS DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL

O capítulo teve por objetivo avaliar, em larga escala, o potencial para a produção de etanol de segunda geração utilizando como parâmetros os rendimentos obtidos nesse estudo e as produtividades em matéria secada das quatro biomassas avaliadas. Visando melhor aproveitamento dos carboidratos da biomassa, a concentração de xilose oriunda do hidrolisado de hemicelulose, resultante do pré-tratamento ácido, foi estimada e a partir desses dados, estimou-se o potencial para produção de etanol.

5.1. Produção de etanol a partir de hexoses

Considerando as produtividades em massa seca ($\text{ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$) de 12 toneladas para o capim-andropogon, 12 toneladas geradas de bagaço de cana-de-açúcar, de 30 toneladas para o capim-elefante e de 33 toneladas para o capim-mombaça e multiplicando-os pelo valores de rendimento ($Y_{E/B}$) de etanol por grama de biomassa obtidos experimentalmente, a projeção em grande escala ficaria de acordo com o exposto na tabela 13 (SANTOS, 2012; ROSSI, 2010; JANK, 1995).

Tabela 10. Estimativa da produção anual de etanol de segunda geração de bagaço de cana-de-açúcar e dos capins andropogon, elefante e mombaça.

Biomassa	Produtividade (MS) (Kg.ha ⁻¹ .ano ⁻¹)	Perda de massa (%)	$Y_{E/B}$ (g/g)	Volume de etanol (L.ha ⁻¹ .ano ⁻¹)
Bagaço de cana-de-açúcar	12.000	32,00	0,14	1.448
Capim-andropogon	12.000	36,00	0,15	1.460
Capim-elefante	30.000	32,00	0,14	3.407
Capim-mombaça	33.000	32,00	0,13	3.480

Produtividade de matéria seca (MS) expressa em quilos por hectare anuais; perda de massa decorrente do pré-tratamento ácido; rendimento de etanol por biomassa ($Y_{E/B}$) e volume de etanol expresso em litros por hectare anuais.

Apesar dos rendimentos ($Y_{E/B}$) de etanol por grama de biomassa para as quatro matérias primas serem semelhantes, os capins-elefante e mombaça se destacam quanto à alta produtividade de biomassa o que possibilita a produção

de volumes de etanol de segunda geração superiores ao dobro dos demais, considerando a mesma área plantada, incluindo o bagaço de cana-de-açúcar, frequentemente explorado em trabalhos científicos. Isso reforça o potencial desses vegetais como fonte de açúcares fermentescíveis para bioprocessos.

5.2. Produção de etanol a partir de pentoses

Uma vez que o produto da hidrólise ácida de hemicelulose, resultante do pré-tratamento, é composto principalmente pelo monossacarídeo xilose (capítulo 1), e que este apresenta potencial como substrato para produção de etanol. Apesar da xilose não ser assimilada por *Saccharomyces cerevisiae*, levedura utilizada neste trabalho, seu uso como substrato em fermentações conduzidas por microorganismos como dos gêneros *Pichia*, *Candida*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Pachysolen*, pode resultar em melhor aproveitamento das biomassas, gerando aumentos significativos no volume de etanol produzido (CHANDEL *et al.*, 2007). Neste trabalho a quantificação foi estimada baseando-se nos valores obtidos da quantificação de açúcares redutores pelo método de Miller (1959).

Tabela 11. Concentração de açúcares redutores do filtrado resultante do pré-tratamento ácido.

Amostra	Concentração de Açúcares Redutores (g/g)
Capim-andropogon	0,32
Bagaço de cana-de-açúcar	0,22
Capim-elefante	0,23
Capim-mombaça	0,17

Ao contrário dos rendimentos de glicose por grama de biomassa obtidos da hidrólise enzimática, os rendimentos de xilose por grama de biomassa, resultantes do pré-tratamento, apresentaram diferenças consideráveis entre si.

Considerando os rendimentos de xilose/g de biomassa ($Y_{X/B}$) obtidos e o rendimento de conversão de xilose em etanol de 0,41 g/g alcançado por Nigam e Singh (2011), em estudo no qual foi feita a fermentação, por *Pichia stipitis*, do produto de hidrólise ácida da hemicelulose de palha de trigo, estima-se que

volumes expressivos de etanol poderiam ser produzidos utilizando as biomassas avaliadas neste estudo (tabela 15).

Com os valores de açúcares redutores, expressos em xilose, ainda que superestimados devido à presença de outros monossacarídeos redutores no hidrolisado, obter-se-ia volumes de etanol próximos àqueles obtidos via fermentação de glicose obtidos neste estudo.

Tabela 12. Estimativa de produção de etanol via fermentação de pentoses oriundas da hidrólise da hemicelulose pelo pré-tratamento ácido e as produtividades do capim-andropogon, bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante e capim-mombaça.

Amostra	$Y_{X/B}$ (m/m)	$Y_{E/X}$ (m/m)	Produtividade (Kg.ha ⁻¹ .ano ⁻¹)	Etanol (L.ha ⁻¹ .ano ⁻¹)
Capim-andropogon	0,32	0,41	12.000	1.995
Bagaço de cana	0,22	0,41	12.000	1.372
Capim-elefante	0,22	0,41	30.000	3.420
Capim-mombaça	0,17	0,41	33.000	2.915

Logo, o aproveitamento do hidrolisado da fração hemicelulósica pode contribuir consideravelmente para o aumento da produção de etanol de segunda geração, favorecendo, dessa forma, a viabilidade de emprego dessa tecnologia em escala industrial.

5.3. Perspectivas de produção de etanol

O etanol de primeira geração obtido a partir dos açúcares extraídos da cana-de-açúcar é considerado o de mais baixo custo de produção do mundo. Além disso, no processo produtivo são geradas toneladas de resíduos como bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo. Mesmo que este apresente importância quanto a sua utilização na co-geração de energia, que alimenta a própria indústria, grande fração excede esta aplicação e é utilizada para diferentes fins. Nesse sentido, a utilização para a produção de etanol de segunda geração pode representar agregação de valor ao produto diante da

possibilidade de utilizar as instalações já existentes das refinarias, com as devidas adaptações, e de aumentar a produtividade da indústria.

De acordo com os dados expostos por Santos *et al.* (2012), o Brasil apresenta uma produtividade média de 85 toneladas de cana-de-açúcar por hectare anuais, e dessas, são obtidas 12 toneladas de bagaço de cana-de-açúcar em base seca. Considerando que a partir dessas 85 toneladas são produzidos em média 7.000 L de etanol de primeira geração, a produção estimada de 1460 L.ha⁻¹ oriundos da fermentação de hexoses, e 1372 L. ha⁻¹ a partir dos açúcares do hidrolisado do pré-tratamento ácido, oriundos do bagaço, totalizaria aproximadamente 9800 L de etanol por hectare.

Na tabela 16, são apresentadas as somas dos volumes de etanol que seriam produzidos, considerando as produtividades das respectivas matérias-primas, tanto pela fermentação de glicose obtida por hidrólise enzimática, quanto à estimada via fermentação de pentoses do hidrolisado resultante do pré-tratamento ácido.

Tabela 13. Estimativa de produção de etanol a partir de pentoses e hexose extraídas de capim-andropogon, bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante e capim-mombaça, via pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática.

Matéria-prima	Etanol (L.ha ⁻¹ .ano ⁻¹)		
	Hexose	Pentose	Total
Capim-andropogon	1.448	1.995	3.443
Bagaço de cana	1.460	1.372	2.832
Capim-elefante	3.407	3.420	6.827
Capim-mombaça	3.480	2.915	6.395

Diante dos valores apresentados (tabela 16) observa-se que cultivo dessas forrageiras com o intuito de produzir etanol de segunda geração contribuiria consideravelmente para o aumento da produção anual deste combustível.

As diferentes características das forrageiras, relacionadas à produtividade, forma de plantio, como a propagação por sementes e robustez quanto às exigências de condições climáticas e de solo são de grande relevância. Aliando essas características, ao melhoramento genético dessas espécies e ao avanço no desenvolvimento de novas tecnologias relacionadas

às etapas constituintes do processo de produção do etanol de segunda geração, o emprego dessas fontes de biomassa como matéria-prima para obtenção de biocombustível torna-se cada vez mais promissor, principalmente quanto ao cultivo em áreas cujas características não favorecem o plantio de cana-de-açúcar.

6. CONCLUSÕES

A avaliação prévia do perfil de hidrólise enzimática das biomassas resultou em curvas de concentração de açúcares redutores semelhantes entre as quatro amostras, mesmo diante dos diferentes percentuais de remoção de hemicelulose resultantes do pré-tratamento, que apresentaram valores de 56 % até 89 %. O complexo celulolítico empregado, sob a concentração equivalente a 20 FPU/g, resultou em rápida conversão dos carboidratos em açúcares redutores em 24 horas de reação, atingindo concentrações de até 22,49 mg/mL, como observado na hidrólise do capim-andropogon, sinalizando este tempo reacional como ideal, diante as condições deste trabalho, para a pré-hidrólise enzimática para o processo de sacarificação e fermentação simultâneas.

A pré-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar resultou em concentração média de glicose de 17,85 g/L que diferiu-se significativamente dos 15,27 g/L e 15,39 g/L resultantes das amostras capim-andropogon e capim-mombaça, respectivamente. Apesar de tal diferença, o processo de sacarificação e fermentação simultâneas gerou fermentados com concentração de etanol que não diferiram significativamente entre si, assim como os rendimentos de etanol por grama de biomassa obtidos.

Adicionalmente à convencional fermentação de glicose, estima-se que o aproveitamento do hidrolisado da fração hemicelulósica resultante do pré-tratamento ácido dessas biomassas, pela fermentação da xilose, pode representar aumentos de até 100 % dos volumes totais de etanol produzidos.

Assim, aliando os rendimentos de produção de etanol e o aproveitamento do hidrolisado da hemicelulose à alta produtividade do capim-andropogon, capim-elefante e capim-mombaça e seus baixos custos de cultivo, estas gramíneas, que são bem adaptadas as condições climáticas do Brasil, representam importantes alternativas de matéria-prima para produção de etanol de segunda geração.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.; BERTILSSON, M.; GORGWA-GRAUSLUND, M.; GORSICH, S.; GUNNAR, L. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 625–638, 2009.

ANDERSON, W. F.; DIEN, B. S.; BRANDON, S. K.; PETERSON, J. D. Assessment of Bermudagrass and Bunch Grasses as Feedstock for Conversion to Ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 145, p. 13-21, 2008.

ATALLA, R. H. **Steam explosion techniques: fundamentals and industrial Applications**. Philadelphia, 1988, p. 97.

BAKKER, B. M.; BRO, C.; KOTTER, P.; LUTTIK, M. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 17, p. 4730-7, 2000.

BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V.; DE OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155-63, 2008.

BATISTA, L. A. R.; GODOY, R. Baetí - EMBRAPA 23, uma nova cultivar do capim-andropogon (*Andropogon gayanus* Kunth). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 24, n. 02, p. 204-213, 1995.

BAUDEL, H. M. **III Workshop Tecnológico sobre: Hidrólise para Produção de Etanol (Pré-Tratamento e Hidrólise)**. 2006. Disponível em: <<http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/Hidrolise%20Baudel%20Pr%E%20Tratamento%20e%20Hidr%F3lise.pdf>>.

BENJAMIN, Y.; CHENG, H.; GÖRGENS, J. F. Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 7–18, 2013.

BOTREL, M.A.; ALVIM, M.J.; XAVIER, D.F. Avaliação de gramíneas forrageiras na região sul de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.4, p.683-689, 1999.

BUCKERIDGE, M. S.; DOS SANTOS, W.; SOUZA, A. P. In: Cortez, L. A. B. **Bioetanol de Cana-de-Açúcar: P&D para Produtividade Sustentabilidade**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda.; 2010, cap. 7.

CAMPOS, F. P.; LANNA, D. P. D.; BOSE, M. L. V.; BOIN, C.; SARMENTO, P. Degradabilidade do capim-elefante em diferentes estágios de maturidade

avaliada pelo método *in vitro*/gás. **Scientia Agricola**, v.59, n.2, p.217-225, 2002.

CANDIDO, R. G.; GODOY, G. G.; GONÇAVES, A. R. Study of sugarcane bagasse pretreatment with sulfuric acid as a step of cellulose obtaining. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 61, p. 101-105, 2012.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, S.S.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n. 44, p. 48-54, 2010.

CARDONA, C. A.; SANCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, 2007.

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

CHENG, V.; NAGWANI, M.; HOLTZAPPLE, M. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 135-159, 1998.

CLAASSEN, P. A. M.; VAN LIER, J. B.; CONTRERAS, A. M. L.; VAN NIEL, E. W. J.; SIJTSMA, L.; STAMS, A. J. M.; DE VRIES, S. S.; WEUSTHUIS, R. A. Utilization of biomass for the supply of energy carriers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 6, p. 741-755, 1999.

COUGHLAN, M. P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. **Biotechnology and Genetic Engineering Review**, v. 3, p. 39-109, 1985.

DE AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando células produzidas pelo fungo *Aspergillus Niger***. 2010. 118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Engenharias e Ciências Exatas, UNIOESTE, Toledo, 2010.

DELGENES, J.; MOLLETA, R.; NAVARRO, J. Effects of lignocelluloses degradation products on ethanol fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**. v.19, p. 220–225, 1996.

DOS SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R. Comparação entre processos em SHF e SSF em de bagaço de cana-de-açúcar para a

produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 1, p. 1–33, 1996.

EGGEMAN, T.; ELANDER, R. Process and economic analysis of pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 2019–2025, 2005.

EMBRAPA. **Potencial do capim-elefante para produção de energia renovável**. EMBRAPA. 2012. Disponível em : <www.embrapa.br>. Acesso em: 08 nov. 2013.

ERIKSSON, T.; KARLSSON, J.; TJERNELD, F. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7A) and endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 101, p. 41–60, 2002.

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

FERRAZ, A. Aplicações da biotecnologia na produção de papel e celulose. In: LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p.465-484.

FREITAS, T. **Álcool feito a partir de restos da cana prepara sua chegada aos postos em 2014**. São Paulo, Mar 2013. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/mercado/1225145-alcool-de-palha-prepara-sua-chegada-aos-postos-em-2014.shtml>> Acesso em: Out. 2013.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

GUPTA, R. **Alkaline pretreatment of biomass for ethanol production and understanding the factors influencing the cellulose hydrolysis**. 2008. 241p. Tese (Doutorado) Auburn University, Alabama, 2008.

HONG, J. Y.; ZHANG, Y. H. P. Quantitative determination of cellulose accessibility to cellulose based on adsorption of a nonhydrolytic fusion protein containing CBM and GFP with its applications. **Langmuir**, v. 23, p. 12535-12540, 2007.

JANK, L. Melhoramento e seleção de variedade de *Panicum maximum*. In: Simpósio sobre manejo e pastagem: o capim colômbio, Anais, Piracicaba: FEALQ, 1995, p.21-58.

JANK, L.; VALÉRIO, J. R.; EUCLIDES, V. B. P. Capim-Massai (*Panicum maximum* cv. Massai): Alternativa para diversificação de pastagens. **Embrapa gado de corte**. Comunicado Técnico n. 69, Nov/2001, 2001.

JURADO, M.; PRIETO, A.; MARTINEZ-ALCALÁ, A.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6378 – 6384, 2009.

KONDO, T. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**. v. 35, p. 717-723, 1997.

KRISHNA, S. H.; RAO, K. C. S.; BABU, J. S.; REDDY, D. S. Studies on the production and application of cellulose from *Trichoderma reesei* QM-9414. **Bioprocess Engineering**, v.22, p.467-470, 2000.

KUHAD, R. C; SINGH, A; ERIKSSON, K. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 57, p. 45-125, 1997.

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

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 2000, 839 p.

LIU, Z. L.; MA, M.; SONG, M. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 282, n. 3, p. 233-44, 2009.

LIU, Z. L.; SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; BERHOW, M. A.; KURTZMAN, C. P.; GORSICH, S. W. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 345-352, 2004.

MEJÍA, M.M. *Andropogon gayanus* Kunt. **Bibliografía analítica**. Cali: CIAT, 196 p. 1984.

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

MOISIER, 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.

MÜLLER, M. S. **Desempenho de *Panicum maximum* (cv. Mombaça) em pastejo rotacionado, sob sistema de irrigação por pivô central, na região do cerrado**. 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

NAVARRO, A. Effects of furfural on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Mathematical models. **Current Microbiology**. v. 19, p. 87–90, 1994.

NIGAM, P.S.; SINGH, A. Production of Liquid Biofuels from Renewable Resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, n 37, p. 52 – 68, 2011.

OLSSON, L.; SOERENSEN, H. R.; DAM, B. P.; CHRISTENSEN, H.; KROGH, K. M.; MEYER, A. S. Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, p. 117-29, 2006.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAH, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25–33, 2000.

PEREIRA, A. F. **Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho**. 2007. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

PEREIRA JÚNIOR, N. Biorrefinarias: rota bioquímica. In: **Química verde no Brasil: 2010-2030**. Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010. p19-75.

PINTO, J.C. **Crescimento e desenvolvimento de *Andropogon gayanus* Kunth, *Panicum maximum* Jacq. e *Setaria anceps* Stapf. Ex Massey cultivados em vasos, sob diferentes doses de nitrogênio**. 1993. 149 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

QUESADA, D.M. **Selecao de genotipos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* schum.) para alta producao de biomassa e eficiencia da fixação biologica de nitrogenio (FBN)**. 2001. 140 p. Dissertação (Mestrado), Rio de Janeiro, 2001.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 136 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RAMOS, L. P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro-industriais. In: **Seminário Nacional sobre Reuso/Reciclagem de Resíduos Sólidos Industriais**. São Paulo, 2000. Disponível em: <http://www.cca.ufscar.br/lamam/disciplinas_arquivos/res/artigo_pretratamento.pdf>. Acesso em 20 mar. 2013.

REDDING, A.; ZIYU WANG, P.; KESHWANI D. R.; CHENG, J. J. High temperature dilute acid pretreatment of coastal Bermuda grass for enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 102, p.1415–1424, 2011.

RIBEIRO JUNIOR, G. O. **Valor nutricional das silagens de capim-andropogon em três idades de corte**. 2013. 205 p. Teste (Doutorado em Zootecnia) - Escola de Veterinária – UFMG, Belo Horizonte, 2013.

RITTER, S. K. Lignocellulose: A Complex Biomaterial. **Chemical & Engineering News**, v 86, p.15, 2008. Disponível em: <cen.acs.org>. Acesso em Mar, 2013.

ROBERTO, C. Etanol celulósico: utopia ou realidade? **Revista Idea News**. N. 83, Setembro, p. 10-17, 2007.

RODRIGUES, R. S. **Produção de enzimas e avaliação do pré-tratamento ácido de biomassas para produção de bioetanol**. Viçosa, 2009. 95 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa.

RORIGUES, A. L. P.; SAMPAIO, I. B. M.; CARNEIRO, J. C.; TOMICH, T. R.; MARTINS, R.G.R.. Degradabilidade *in situ* da matéria seca de forrageiras tropicais obtidas em diferentes épocas de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v 56 p. 658-664, 2004.

ROSSELL, C. E. V. Fermentação Alcoólica do Licor Resultante da Hidrólise. In: **III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise para Produção de Etanol**. Grupo Energia - Projeto Etanol, MCT/NIPE, UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2007.

ROSSI, D. A. **Avaliação morfoagronômica e da qualidade da biomassa de acessos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) para fins energéticos no norte Fluminense**. 2010. 66 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campo dos Goytacazes, 2010.

RYDHONLM, S. A. **Pulping processes**. New York: Interscience, 1965.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. **Biotechnology Progress**, v 22, n. 2, p. 449-453, 2006.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnolgy**, v 30, n. 5, p. 279-29, 2003.

SAMUEL, R.; PU, Y.; FOSTON, M.; RAGAUSKAS, A. J. Solid-state NMR characterization of switchgrass cellulose after dilute acid pretreatment. **Biofuels**, v. 1, p. 85-90, 2010.

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

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v 37, p. 19-27, 2012.

SHULER, M. L.; KARGI, F. Bioprocess Engineering – Basic Concepts. Prentice Hall In. **Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences**. New Jersey, 1992. 576p.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 123 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SOUZA, C. J. A. ; COSTA, D. A. ; RODRIGUES, M. Q. R. B. ; DOS SANTOS, A. F. ; LOPES, M. R. ; ABRANTES, A. B. P. ; DOS SANTOS, C. P.; SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F. M. L.; FIETTO, L. G. The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 63-69, 2012.

SREEKUMAR, O.; CHAND, N., BASAPPA, S.. Optimization and interaction of media components in ethanol production using *Zymomonas mobilis* by response surface methodology. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 3, p. 334-338, 1999.

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

SURYAWATI, I.; WILKINS, M.; BELLMER, D. D.; HUHNKE, R. L; MANESS, N.; BANAT. I. M. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Kanlow Switchgrass Pretreated by Hydrothermolysis Using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, p. 894-902, 2008.

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v.10, n. 5/6, p.367-375, 1996.

TAHERZADEH, M.; EKLUND, R.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDEN, G. Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 36, p. 4659–4665, 1997.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources**, v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007.

THOMAS, D.; ANDRADE, R.P.; COUTO, W.; ROCHA, C. M. C.; MOORE, P. Principais características forrageiras: *Andropogon gayanus*, var. *bisquamulatus* cv. Planaltina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.16, n.3, p.347-355, 1981.

VAN MARIS, A. J.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 4, p. 391-418, 2006.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.74, n.10, p. 3583-3597, 1991.

VIALJAMAE, P.; KIPPER, K.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G. Synergistic cellulose hydrolysis can be described in terms of fractal-like kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 84, p. 254–257, 2003.

VILELA, H. Produção de Biomassa de Capim Elefante. **Portal agronomia**. 2009. Disponível em:
<http://www.agronomia.com.br/conteudo/artigos/Producao_de_Biomassa_de_Capim_Elefante_Paraiso.htm>. Acesso em 2013.

VILELA, L.; OLIVEIRA, E. M.; JUNIOR, R. G.; RAMOS, A. K. B.; FERNANDES, F. D.; JUNIOR, G. B. M. Concentração mineral de genótipos de *Panicum maximum* cultivados em solo de cerrado. In: **IX Simpósio Nacional Cerrado-Brasília DF**, 2009.

WALLIS, A. F. A.; WEARNE, R. H.; WRIGHT, P. J. Chemical analysis of polysaccharides in plantation eucalypt woods and pulps. **Appita Journal**, v. 49, n. 4, p. 258-262, 1996.

WILKINS, M. R.; MUELLER, M.; EICHLING, S.; BANAT, I. M. Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains *Kluyveromyces marxianus* IMB2,

IMB4, and IMB5 under anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 346-350, 2008.

WINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G.. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood a comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnology Progress**. v. 19, p. 1109-1117, 2003.

WINGREN, A.; GALBE, M.; ROSLANDER, C.; RUDOLF, A.; ZACCHI, G. Effect of reduction in yeast and enzyme concentrations in a simultaneous saccharification and fermentation based bioethanol process - Technical and economic evaluation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 485-499, 2005.

WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIIKARI, L. In: Dumitriu, S. **Polysaccharides: Strutral Diversity and Functional Versatility**. cap. 43 New York: Ed. Dekker, 2005.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S. Instituto Adolf Lutz: métodos físico-químicos para análise de alimentos. In: _____. **Bebidas alcoólicas**. Brasília: ed. MS, 2005. 1018 p.

ZHANG, Y.H.P.; DING, S.Y.; MIELENZ, J.R.; CUI, J.B.; ELANDER, R.T.; LASER, M.; HIMMEL, M.E.; MCMILLAN, J.R.; LYND, L.R. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 214–223, 2007.

ZHANG, P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R.; A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 888-898, 2006.

.