



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DA HIDRÓLISE ÁCIDA E
ENZIMÁTICA DA PALMA FORRAGEIRA**

ALBERTO BRANDÃO TORRES NETO

Campina Grande – PB

Abril, 2015

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DA HIDRÓLISE ÁCIDA E
ENZIMÁTICA DA PALMA FORRAGEIRA**

ALBERTO BRANDÃO TORRES NETO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento às exigências para obtenção do Grau de Doutor.

Área de Concentração: Recursos Regionais e Meio Ambiente

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Líbia de Sousa Conrado Oliveira

Campina Grande
Abril, 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

T693p Torres Neto, Alberto Brandão.
Produção de bioetanol a partir da hidrólise ácida e enzimática da palma forrageira / Alberto Brandão Torres Neto. – Campina Grande, 2015.
67 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2015.

"Orientação: Prof.^a Dr.^a Líbia de Sousa Conrado Oliveira."
Referências.

1. Etanol de Segunda Geração. 2. *Opuntia Ficus-Indica* Mill.
3. Hidrólise. 4. Material Lignocelulósico. I. Oliveira, Líbia de Sousa Conrado. II. Título.

CDU 661.722(043)

PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DA HIDRÓLISE ÁCIDA E ENZIMÁTICA DA PALMA FORRAGEIRA

Área de concentração: Recursos Regionais e Meio Ambiente

Data da defesa: 30/04/2015

Resultado: aprovado

BANCA EXAMINADORA



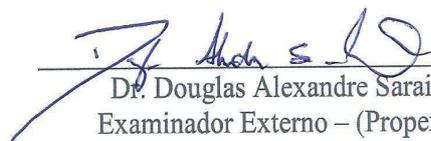
Prof.^a Dr.^a Libia de Sousa Conrado Oliveira
Orientadora – (UAEQ - CCT - UFCG)



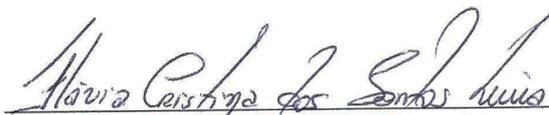
Prof. Dr. Severino Rodrigues de Farias Neto
Examinador Interno – (UAEQ - CCT - UFCG)



Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva
Examinador Externo – (DEQ - CT - UFPB)



Dr. Douglas Alexandre Saraiva Leão
Examinador Externo – (Propex/UFCG)



Prof.^a Dr.^a Flávia Cristina dos Santos Lima
Examinadora Externa – (DDE - IFPE)

Campina Grande – PB
Abril, 2015

*À meus avós: Alberto Brandão Torres e
Severina Medeiros Torres
(in memória)*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar minha vida e a todos os meus familiares, dando-nos força para superar os obstáculos da vida.

A meus avós, Alberto Brandão e Severina Medeiros (in memória), por me terem criado, educado e ensinado os caminhos a seguir; sei das dificuldades que cada um enfrentava mas, mesmo assim, esforçaram-se e contribuíram bastante para eu ser a pessoa que sou hoje.

A meus irmãos, Janaina, Daniela e Daniel que mesmo com a distância imposta pelo destino, estiveram presentes e sempre unidos ajudando uns aos outros.

A minha esposa, Mônica, pessoa maravilhosa que entrou na minha vida só para somar, vem enfrentando comigo todas as dificuldades, mas também compartilhando as nossas alegrias, e aos meus filhos André e Amanda, que mesmo sem entenderem muita coisa da vida, me fortalecem a cada dia que passa e a minha enteada Carolina, por ter de alguma forma também colaborado na execução deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Engenharia Bioquímica que tanto me ajudaram nessa jornada e sem os quais não teria sido possível a conclusão dos trabalhos, principalmente Jardes, Neto, Ravena, Rebeca, Douglas e Beatriz.

À esta banca examinadora, em especial ao Prof. Flávio Luiz Honorato da Silva, pelo seu apoio desde a época da graduação, sempre sendo um eterno orientador em minha vida.

À minha orientadora, Líbia de Sousa Conrado Oliveira, por ter confiado no meu trabalho, orientado e, principalmente, buscado alternativas e soluções para a conclusão dos nossos experimentos, mesmo com as dificuldades apresentadas durante estes quase quatro anos em que estive no programa.

Ao senhor José da Banha, como é conhecido, proprietário da fazenda que nos forneceu toda matéria-prima utilizada neste trabalho.

À Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), através do PPGEQ, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado e a CAPES, pelo apoio à pesquisa e pelo incentivo financeiro.

Às empresas CBB Biomassa e Bioprocessos pela doação dos insumos utilizados na fermentação alcoólica (leveduras e nutrientes e, também, à Prozyn, que nos doou as enzimas β -glicosidase utilizadas na hidrólise enzimática.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

*“O início da sabedoria é a admissão da própria ignorância. Todo o meu
saber consiste em saber que nada sei”.*

Sócrates

RESUMO

A busca por alternativas à produção de etanol para atender a atual demanda faz surgir como matérias-primas alternativas ao caldo de cana-de-açúcar (etanol de 1ª geração), os materiais lignocelulósicos (etanol de 2ª geração), que apresentam em sua composição celulose, hemicelulose e lignina que podem ser convertidos, por meio de processos químicos e bioquímicos (hidrólises ácida e enzimática) em açúcares fermentáveis e, posteriormente, nesse biocombustível. Como material lignocelulósico surge-se a palma forrageira, uma cultura amplamente difundida, de fácil manejo e cultivada em todos os períodos do ano. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar os processos de hidrólises ácida/enzimática da palma forrageira para a sacarificação da celulose visando a produção de etanol, caracterizando-a físico-quimicamente/morfologicamente, além de realizar os processos químicos e bioquímicos da conversão da celulose, como também da hemicelulose em açúcares diretamente fermentáveis, verificando, por meio da metodologia de planejamento experimental, a influência das variáveis temperatura, concentração de ácido sulfúrico e relação massa seca de palma/ácido (hidrólise ácida) sobre concentração de glicose, como também a carga enzimática, bem como a relação massa seca de palma/extrato (hidrólise enzimática) sobre o rendimento de conversão da celulose em glicose, finalizando com a fermentação do licor hidrolisado obtido nas melhores condições do planejamento, determinando assim, os parâmetros do processo. Os resultados obtidos mostraram que a palma apresenta uma boa composição de celulose (37,34%) comparada a outros materiais estudados e baixos teores de hemicelulose (10,88%) e lignina (3,36%), dispensando-se assim, a realização de um pré-tratamento à hidrólise deste material. Os baixos teores de hemicelulose e lignina também puderam ser verificados por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) que demonstraram um grau de desordem acentuado para a palma forrageira. Os modelos estatísticos obtidos para as hidrólises ácida/enzimática foram estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança, mostrando que, para hidrólise ácida, aumentando-se a concentração de ácido, diminuindo-se a relação massa seca de palma/ácido obtém-se concentrações de glicose no licor acima de 7500 mg/L, enquanto para a hidrólise enzimática, aumentando-se a carga enzimática e diminuindo-se a relação massa seca de palma/extrato obtém-se rendimentos de conversão maiores que 60%. Os parâmetros fermentativos do hidrolisado calculados mostraram que a palma forrageira apresenta-se como fonte potencial à produção de etanol, com conversão dos açúcares fermentáveis em torno de 98%.

Palavras-chave: etanol de segunda geração, *Opuntia fícus-indica* Mill, hidrólise, material lignocelulósico.

ABSTRACT

The pursuit for alternatives to ethanol production in order to meet the current demand raises as raw materials, besides the sugarcane broth (first generation ethanol), the lignocellulosic materials (second generation ethanol), which have in their composition cellulose, hemicellulose and lignin, that through chemicals and biochemical processes (acid and enzymatic hydrolysis) can be converted into fermentable sugar and, after, into biofuel. As an example the lignocellulosic material, there is the cactus pear, with a widespread cropping of easy handling and cultivated in all periods of the year. Therefore, the main goal of this paper was to study the cactus pear process of acid/enzymatic hydrolysis for cellulose saccharification aiming ethanol production, characterizing it physic chemically and morphologically, besides perform chemical and biochemical processes of cellulose conversion, as well for the hemicelulose into directly fermentable sugars, verifying by the experimental design, the influence of the variables: temperature and sulfuric acid concentrations and the relation dry mass of cactus pear/acid concentration (acid hydrolysis) over the glucose concentration. It was also studied the enzyme load and the relation dry mass of cactus pear/extract (enzymatic hydrolysis) over the conversion of cellulose into glucose efficiency, ending with the fermentation of the hydrolyzed liquor, gathered in the best experimental design conditions, setting then the process parameters. The results indicated that the cactus pear presents a considerable cellulose content (37.34%) compared to other studied sources and low contents of hemicellulose (10.88%) and lignin (3.36%), dismissing the execution of a pre-treatment in this material. The low contents of hemicellulose and lignin also were verified by the Scanning Electron Microscopy (SEM), which shows a high disorder level for the cactus pear. The statistic models obtained for the acid and enzymatic hydrolysis were statically significant with 95% reliability. The results showed that, for the acid hydrolysis, raising the acid concentration and lowering the relation dry mass of cactus pear/acid it is obtained glucose concentrations in the liquor above 7500 mg/L, while for the enzymatic hydrolysis, raising de enzymatic load and lowering the relation dry mass of cactus pear/extract it is obtained conversion efficiency above 60%. The hydrolyzate fermentation parameters calculated showed that cactus pear presents itself as a potential source for ethanol production, with conversion of fermentable sugars around 98%.

Keywords: second generation ethanol, *Opuntia ficus-indica* Mill, hydrolyze, lignocellulosic material.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Complexo lignocelulósico - cadeias de celulose envolvidas por hemicelulose e lignina.....	8
Figura 2: Representação da cadeia linear da celulose.....	10
Figura 3: Representação das cadeias de celulose ligadas por pontes de hidrogênio.....	11
Figura 4: Açúcares que compõem as unidades de hemiceluloses.....	12
Figura 5: Componentes extraídos da hemicelulose.....	13
Figura 6: Estrutura da lignina de eucalipto.....	15
Figura 7: Componentes extraídos da lignina.....	15
Figura 8: Plantio de palma forrageira do tipo miúda.....	16
Figura 9: Esquema do processo de produção de etanol por meio de hidrólise da biomassa.....	20
Figura 10: Representação esquemática da ação das celulasas sobre a celulose para geração de glicose.....	23
Figura 11: Sequência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
Figura 12: Reator de aço inoxidável utilizado na hidrólise ácida.....	33
Figura 13: Cromatógrafo líquido de alta eficiência.....	35
Figura 14: Incubadora shaker.....	37
Figura 15: Fermentação alcoólica.....	39
Figura 16: Microscopias eletrônica de varredura da palma <i>in natura</i> (a)100x, (b)500x, (c)1000x e (d)3000x.....	45
Figura 17: Microscopias eletrônica de varredura 500x (a) pedúnculo de caju <i>in natura</i> ; (b) pedúnculo de caju pré-tratado; (c) fibra de sisal <i>in natura</i> ; (d) fibra de sisal pré-tratada....	46
Figura 18: Diagrama de Pareto para a hidrólise ácida.....	48
Figura 19: Superfície de resposta para o planejamento da hidrólise ácida (C) – concentração do ácido; (R) – relação massa seca de palma/ácido.....	49
Figura 20: Cinética da hidrólise enzimática para os experimentos 1, 2, 3 e 4 do planejamento experimental.....	50

Figura 21: Cinética da hidrólise enzimática para os experimentos 5, 6, e 7 do planejamento experimental (pontos centrais).....	51
Figura 22: Diagrama de Pareto para o planejamento da hidrólise enzimática para o tempo de 24 horas.....	53
Figura 23: Superfície de resposta para o planejamento da hidrólise enzimática no tempo de 24 horas.....	54
Figura 24: Perfis da cinética da fermentação alcoólica do licor hidrolisado enzimaticamente.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química parcial de alguns materiais lignocelulósicos.....	9
Tabela 2: Conteúdo médio celulósico em plantas.....	10
Tabela 3: Principais diferenças entre celulose e hemicelulose.....	13
Tabela 4: Composição químico-bromatológica da palma forrageira.....	17
Tabela 5: Usos e aplicações potenciais da palma forrageira.....	19
Tabela 6: Exemplo dos métodos de pré-tratamentos mais utilizados.....	21
Tabela 7: Comparação da hidrólise ácida e enzimática.....	24
Tabela 8: Matriz do planejamento fatorial 2^3	34
Tabela 9: Níveis codificados e reais das variáveis independentes para o planejamento fatorial 2^3	34
Tabela 10: Matriz do planejamento fatorial 2^2	36
Tabela 11: Níveis codificados e reais das variáveis independentes para o planejamento fatorial 2^2	36
Tabela 12: Quantidades de palma, preparação enzimática (Celluclast 1.5L), tampão citrato de sódio e tetraciclina utilizadas em cada experimento do planejamento experimental.....	38
Tabela 13: Caracterização físico-química da palma forrageira.....	43
Tabela 14: Concentração de glicose obtida no planejamento experimental 2^3	47
Tabela 15: ANOVA para a resposta concentração de glicose.....	48
Tabela 16: Resultados da cinética para o planejamento experimental da hidrólise enzimática.....	50
Tabela 17: Valores da probabilidade de significância (p) e do coeficiente de determinação (R^2).....	51
Tabela 18: Rendimentos obtidos no planejamento experimental 2^2 para o tempo de 24 horas.....	52
Tabela 19: ANOVA para a resposta rendimento da hidrólise enzimática no tempo de 24 horas.....	53
Tabela 20: Parâmetros fermentativos da fermentação do licor hidrolisado enzimaticamente.....	56

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Objetivos.....	4
1.1.1. Objetivo geral.....	4
1.1.2. Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO 2.....	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. Biomassa lignocelulósica.....	7
2.1.1. Celulose.....	9
2.1.2. Hemicelulose.....	11
2.1.3. Lignina.....	14
2.2. Palma forrageira.....	16
2.3. Hidrólise de materiais lignocelulósicos.....	20
2.3.1. Hidrólise ácida da celulose.....	21
2.3.2. Hidrólise enzimática da celulose.....	22
2.4. Fermentação alcoólica.....	24
2.4.1. Bioquímica da fermentação alcoólica.....	25
2.4.2. Fatores que afetam a fermentação.....	27
2.5. Estado da arte.....	28
CAPÍTULO 3.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Matéria-prima.....	32
3.2. Coleta e seleção.....	32
3.3. Lavagem.....	32
3.4. Secagem.....	32
3.5. Caracterização.....	32
3.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	33
3.7. Hidrólise ácida.....	33
3.7.1. Concentração de glicose.....	35
3.8. Hidrólise enzimática.....	35
3.8.1. Preparação enzimática utilizada na hidrólise.....	37

3.8.2. Determinação da atividade enzimática total (FPU/mL).....	38
3.9. Fermentação alcoólica.....	39
3.9.1. Determinação da concentração de células.....	40
3.9.2. Determinação dos parâmetros fermentativos.....	40
3.9.2.1. Fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$).....	40
3.9.2.2. Produtividade em etanol (PE).....	40
3.9.2.3. Eficiência de conversão (E).....	41
CAPÍTULO 4.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1. Caracterização da palma forrageira.....	43
4.2. Análise morfológica da palma forrageira por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	44
4.3. Hidrólise ácida.....	46
4.4. Hidrólise enzimática.....	49
4.5. Fermentação alcoólica.....	55
4.6. Considerações finais.....	57
CAPÍTULO 5.....	59
5. CONCLUSÕES.....	60
CAPÍTULO 6.....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

Capítulo 1

Introdução e Objetivos

1. INTRODUÇÃO

A produção de etanol como combustível foi motivada, inicialmente, pela crise internacional do petróleo ocorrida na década de 70, onde preços elevados do barril obrigaram o governo brasileiro a tomar algumas medidas com a intenção de diminuir a dependência dos combustíveis derivados dessa matéria-prima, visto que naquela época a maior parte do petróleo consumido no Brasil era obtida via importação.

Além dos impactos econômicos atrelados à utilização dos combustíveis derivados do petróleo, o emprego dos biocombustíveis vem sendo motivado pelos impactos ambientais causados pela queima dos combustíveis fósseis, ocasionando o que é conhecido como efeito estufa.

O Brasil vem, desde a década de 70, utilizando apenas etanol como combustível automotivo ou sob a forma de uma mistura contendo de 18% a 25% de etanol na gasolina, colocando o país em uma posição extremamente favorável internacionalmente, em termos de emissão de CO₂. Atualmente, o país produz em média 25 bilhões de litros de etanol por ano a partir da cana-de-açúcar. O plantio dessa matéria-prima, realizado em terras aráveis de boa qualidade, deverá ser expandido devido à crescente demanda nacional e internacional de etanol (MAPA, 2010).

O êxito da substituição de derivados do petróleo na forma líquida no Brasil, a partir de 1975, com o Proálcool, garantiu ao país uma fonte renovável e limpa. Com o “**know-how**” da capacidade técnica da produção ocorreu a viabilização da produção de etanol em maior quantidade possível de matérias-primas agrícolas alternativas à cana-de-açúcar, como o próprio bagaço e a palha da cana-de-açúcar. A cultura agrícola da cana-de-açúcar apresenta caráter sazonal (6 meses de safra), aumentando o custo final do litro de etanol produzido e onerando os custos de produção em virtude de uma ociosidade no investimento da ordem de seis meses.

Desta forma, a busca por fontes renováveis de energia e de alternativas ao uso do petróleo está mobilizando internacionalmente e de forma ímpar setores acadêmicos, industriais, sociais e governamentais com ênfase no desenvolvimento de processos biotecnológicos de menor impacto ambiental (PEREIRA JR. et al. 2008).

Sendo o Brasil um país de dimensões favoráveis para o cultivo agrícola, uma alternativa recomendável é conferir, às futuras usinas produtoras de etanol combustível, caráter polivalente, ou seja, torná-las capazes de operar com diferentes gamas de matérias-primas potencialmente disponíveis na região, aumentando, desta forma, a eficiência da estrutura produtiva e a capacidade de inovação e da expansão das exportações do país,

segundo as diretrizes do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (2006), no plano de Estratégia Nacional de Biotecnologia.

Um novo paradigma mundial em combustíveis e energia renováveis é a produção de etanol de materiais lignocelulósicos (BASTOS, 2007). Segundo Silva (2010), um dos desafios da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica consiste em determinar o melhor processo para obtenção dos monossacarídeos. O processo de hidrólise escolhido deve ser economicamente viável, em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado.

Diversos processos têm sido explorados nos últimos anos, com o objetivo de hidrolisar os polissacarídeos celulose e hemicelulose em glicose e xilose, respectivamente. A maioria dos métodos utilizados tende ao uso de enzimas microbianas ou ácido sulfúrico em concentrações variadas (BALAT et al. 2008).

Para a produção do etanol utilizando-se da biomassa lignocelulósica, são necessárias quatro etapas de operação, diferentemente de matérias-primas açucaradas, como cana-de-açúcar e frutas, são elas: pré-tratamento, hidrólise ácida ou enzimática, fermentação alcoólica e destilação.

Para as etapas da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica têm-se, como desafios, a redução do custo da hidrólise enzimática, ou seja, redução dos custos das enzimas e, na hidrólise ácida, a minimização da presença da formação de substâncias inibidoras da fermentação alcoólica (BASTOS, 2007; PEREIRA JR., 2006). Acrescenta-se ainda como desafio a realização do pré-tratamento, buscando-se otimizar essa etapa para aumentar a eficiência das hidrólises bem como reduzir as perdas decorrentes desse.

Dentre as muitas culturas alternativas à produção de etanol, a palma forrageira surge como possível alternativa por ser uma cultura bastante. Atualmente, esta cultura vegetal se presta às mais diversas utilidades, por ser amplamente difundida, de fácil plantio e altamente resistente à seca (ALMEIDA NETO et al., 2005). No entanto, nos últimos anos a palma vem sofrendo ataques da cochonilha do carmim (*Dactylopius coccus*), sendo estes observados nos estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará (SANTOS et al., 2006).

Para tentar solucionar os problemas com a cochonilha, Vasconcelos et al. (2009) vem realizando uma seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius coccus*) visando combater esta praga que pode dificultar a disseminação da mesma nas regiões afetadas, que segundo Lara (1991), a melhor alternativa de cultivo para a palma em regiões atacadas por esse inseto é o plantio destes

clones resistentes. Essa alternativa se destaca como estratégia ideal do controle de pragas, pois sua utilização reduz a população do inseto a níveis toleráveis, tem efeito cumulativo e persistente, não é poluente, não acarreta ônus ao sistema de produção e não exige conhecimentos específicos dos agricultores para sua utilização.

Com isto, o esforço na busca de alternativas para a produção de etanol se apresenta bastante atrativa para o setor. Endossado pela preocupação mundial, que desponta acentuadamente no sentido da busca de alternativas para tecnologias e combustíveis que sejam renováveis e possuam menor impacto ambiental, a busca por um aproveitamento melhor da cultura da palma forrageira tem incentivado pesquisadores do Nordeste brasileiro no estudo de ampliação do aproveitamento dessa cultura.

Com tal filosofia, busca-se aumentar a produção da palma forrageira em escala agrícola, atender às necessidades de desenvolvimento socioeconômico e tecnológico da região e, dentre possíveis inovações, surge, como proposta, a produção de etanol por hidrólise ácida e enzimática utilizando-a, que pode vir a complementar a produção deste combustível em períodos de entressafra, aumentando o tempo de operação das unidades fabris (usinas).

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Estudar os processos de hidrólises ácida e enzimática da palma forrageira para a sacarificação da celulose contida neste material visando à produção de bioetanol.

1.1.2. Objetivos específicos

- Realizar a caracterização físico-química da matéria-prima palma forrageira (umidade, cinzas, extrativos, lignina, holocelulose, α -celulose e hemicelulose);
- Caracterizar a palma forrageira quanto à sua morfologia pelo método de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Estudar a hidrólise ácida da palma forrageira verificando a influência das variáveis temperatura, concentração de ácido e relação massa seca de palma/ácido sobre o processo (concentração total de glicose), utilizando-se da metodologia de planejamento fatorial 2^3 ;
- Estudar a hidrólise enzimática da palma forrageira, verificando a influência das variáveis carga enzimática e relação massa seca de palma/extrato enzimático sobre o

processo (eficiência de conversão em glicose), utilizando-se da metodologia de planejamento fatorial 2^2 ;

- Realizar a cinética da fermentação alcoólica do licor hidrolisado nas condições otimizadas fornecidas pelo planejamento experimental e determinar os parâmetros cinéticos do processo.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomassa lignocelulósica

Toda matéria orgânica não fóssil e de origem vegetal, ou de seus processos de transformação natural ou artificial, que pode ser explorada para fins energéticos, é denominada biomassa lignocelulósica. Esses materiais têm em comum a origem direta ou indireta do processo de fotossíntese. Por essa razão, são formados periodicamente e sua produção não está limitada com o tempo, ou seja, são renováveis, tornando-se uma matéria-prima para a produção de energia com boa relação custo-benefício. Dentre os materiais lignocelulósicos incluem vários resíduos agrícolas, agroindustriais, urbanos e da indústria de papel, madeira, dentre outros similares (TAMANINI e HAULY, 2004).

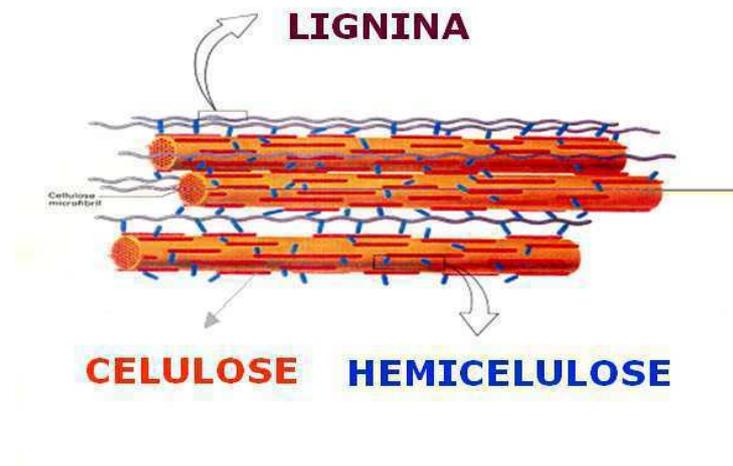
Os materiais lignocelulósicos podem ser convertidos, por meio de processos químicos e bioquímicos, em combustíveis líquidos, entre eles o bioetanol. A produção deste combustível é realizada através da fermentação de açúcares, geralmente a partir de três tipos de matéria-prima, açúcar de cana ou de beterraba, cereais (mediante fermentação dos açúcares do amido) e biomassa lenhosa (mediante a fermentação dos açúcares contidos na celulose e na hemicelulose) (ADENE e AREAC, 2005).

Com o aumento da demanda por esse biocombustível, devido às questões geopolíticas e os impactos ambientais causados pelos combustíveis fósseis, procura-se aperfeiçoar e aumentar as possibilidades de produção de etanol, surgindo a necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias para a produção do etanol celulósico, que utiliza matéria-prima fibrosa dos materiais lignocelulósicos (LIMA e RODRIGUES, 2007).

As tecnologias para a obtenção do etanol lignocelulósico produzidos a partir de matérias lignocelulósicas envolvem inicialmente a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa por meios de rotas ácidas ou enzimáticas, em açúcares fermentáveis, com sua posterior fermentação. É de fundamental importância conhecer a estrutura e a composição desses materiais, uma vez que a biomassa afeta diretamente na natureza e nos rendimentos desses processos.

A biomassa lignocelulósica é formada por estruturas duras e fibrosas, composta, basicamente, de celulose e hemicelulose. Estas estruturas estão ligadas por outra fibra chamada de lignina, conforme apresentada na Figura 1, além de pequenas quantidades de outros componentes extrativos.

Figura 1: Complexo lignocelulósico - cadeias de celulose envolvidas por hemicelulose e lignina



PEREIRA JR (2008)

A celulose, principal componente da parede celular da fibra vegetal, é um polímero linear de D-glicose cujas unidades estão unidas por ligações β com uma estrutura cristalina altamente ordenada e de alta massa molar. A lignina é composta de um conjunto de polímeros amorfos reticulares de alta massa molar, geralmente associado à celulose e à hemicelulose, com estrutura química fortemente aromática. As hemiceluloses são macromoléculas ramificadas compostas de polissacarídeos de baixa massa molar associadas à parede celular das plantas com a celulose e a lignina. São heteroglicanos constituídos por, relativamente, poucos resíduos de açúcar, sendo os mais comuns a D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose e L-arabinose, que conferem características aos diferentes tipos de hemicelulose, como arabinogalactana, galactoglicomanana, glicomanana e arabinoxilana (CARVALHO et al., 2005).

A Tabela 1 apresenta a variação da composição química de algumas biomassas de composição lignocelulósica.

Tabela 1: Composição química parcial de alguns materiais lignocelulósicos

Material Lignocelulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Farelo de cevada	23,0	32,7	24,4
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3
Folhas de milho	37,6	34,5	12,6
Bagaço de cana	40,2	26,4	25,2
Palha de arroz	43,5	22,0	17,2
Palha de trigo	33,8	31,8	20,1
Palha de sorgo	34,0	44,0	20,0
Casca de aveia	30,5	28,6	23,1
<i>Eucalyptus grandis</i>	40,2	15,7	26,9
<i>Eucalyptus globulus</i>	46,3	17,1	22,9

Fonte: Adaptado de TAMANINI e HAULY (2004)

De acordo com a Tabela 1 verifica-se que a composição básica da biomassa lignocelulósica depende do vegetal de origem. No caso de biomassa agro-florestais, outros fatores podem interferir tais como: região, idade e período de coleta do material. Segundo Lima e Rodrigues (2007) a escolha da espécie produtora de biomassa é um passo fundamental na produção do etanol celulósico.

Deve ser levada em conta sua produtividade, a produtividade de celuloses e hemiceluloses e a produtividade e tipo de lignina presente.

2.1.1. Celulose

A celulose responde isoladamente em cerca de 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera, sendo a fonte mais abundante de carbono que é o elemento base dos componentes orgânicos. A mesma é bastante utilizada como uma fonte de fornecimento de recursos de alimento e de energia aos longos dos anos (ZHANG e LYND, 2006). Com uma estimativa de produção de 50 bilhões de toneladas por ano, a celulose é o material orgânico mais abundante na natureza, sendo o principal constituinte das plantas (na faixa aproximada de 35 a 50%) (KLOCK et al., 2005).

De acordo com Lynd et al. (2002), a celulose também está presente em pequenas proporções de algas e poucas bactérias. Já no algodão a celulose encontra-se quase que pura. No entanto, na maioria dos casos, a celulose está presente em uma matriz com outros biopolímeros estruturais, como a hemicelulose e lignina.

Os conteúdos médios de celulose em algumas plantas estão sendo exemplificados na Tabela 2.

Tabela 2: Conteúdo médio celulósico em plantas

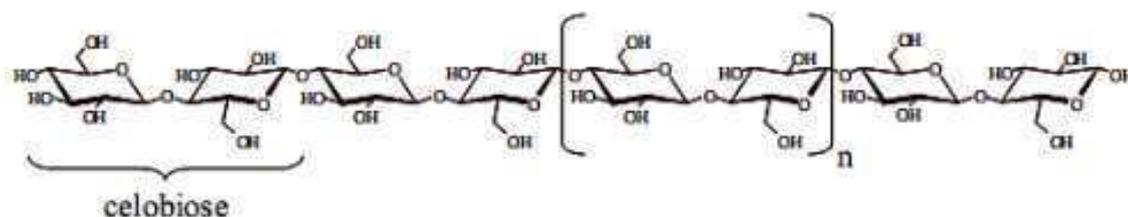
Planta	Celulose (%)
Algodão	95 – 99
Madeira	40 – 50
Cascas de árvores	20 – 30
Musgos	25 – 30
Engaço de bananeira	53 – 54
Bactérias	20 – 30
Cana-de-açúcar	58 – 59

Fonte: KLOCK et al. (2005)

Os primeiros estudos da química da celulose iniciaram-se em 1838 com Payen, que demonstrou que o tecido das plantas contém um componente majoritário com 44,4% de carbono, 6,2% de hidrogênio e 49,3% de oxigênio por análise alimentar, o que é equivalente a uma fórmula empírica de $C_6H_{10}O_5$ e com massa molar de 162 g/mol. Evidências conseguidas após 1930 provaram que a celulose é um polímero composto por um grande número de unidades repetidas (KLOCK et al., 2005).

Dessa forma, pode-se dizer que a celulose é composta por unidades repetitivas de duas moléculas de glicose esterificadas por ligações β -1,4-glicosídicas. Essa unidade repetitiva é conhecida como celobiose, a qual contém seis grupos hidroxilas que estabelecem interações do tipo ligações de hidrogênio intra e intermolecular, como representada na Figura 2. Com isso define-se celobiose como unidade conformacional mínima da celulose, enquanto a glicose representa tão somente a unidade fundamental das cadeias do homopolímero (SILVA et al. 2009).

Figura 2: Representação da cadeia linear da celulose

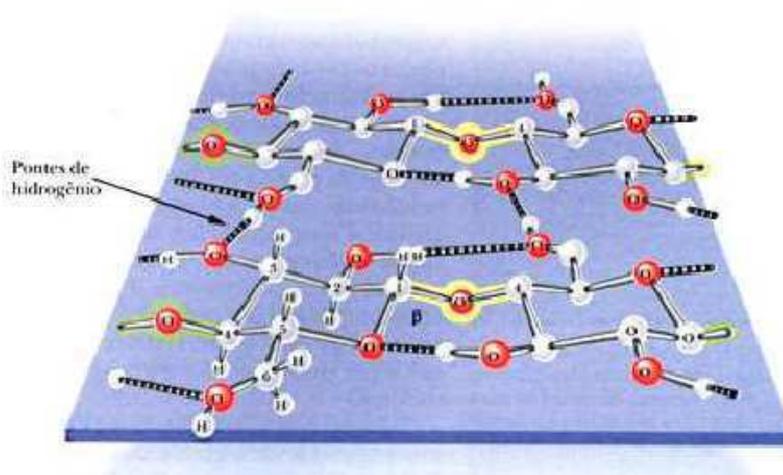


TIMAR-BALAZSY e EASTOP (1998)

Essas ligações intra e intercelular são responsáveis por certas propriedades da celulose, pois geram uma alta rigidez na estrutura e proporcionam um elevado grau de organização cristalina devido à formação de fibrilas que, sob condições normais, torna a celulose extremamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, sendo essas características necessárias para sua própria função como armação estrutural nas paredes celulares vegetais.

As cadeias de celulose e suas ligações intra e inter-cadeia são apresentadas na Figura 3.

Figura 3: Representação das cadeias de celulose ligadas por pontes de hidrogênio



CAMPBELL (2000)

De acordo com Silva et al. (2009), o grau de cristalinidade da celulose varia de acordo com sua origem e processamento, como por exemplo, a celulose do algodão possui cadeias mais ordenadas, apresentando cristalinidade de aproximadamente 70%, enquanto a celulose de madeira apresenta índice de cristalinidade em torno de 40%.

Estas características atribuem à celulose uma grande resistência à hidrólise, o que representa um grande desafio com relação à utilização dessas biomassas lignocelulósicas em processos biotecnológicos a produção de bioetanol.

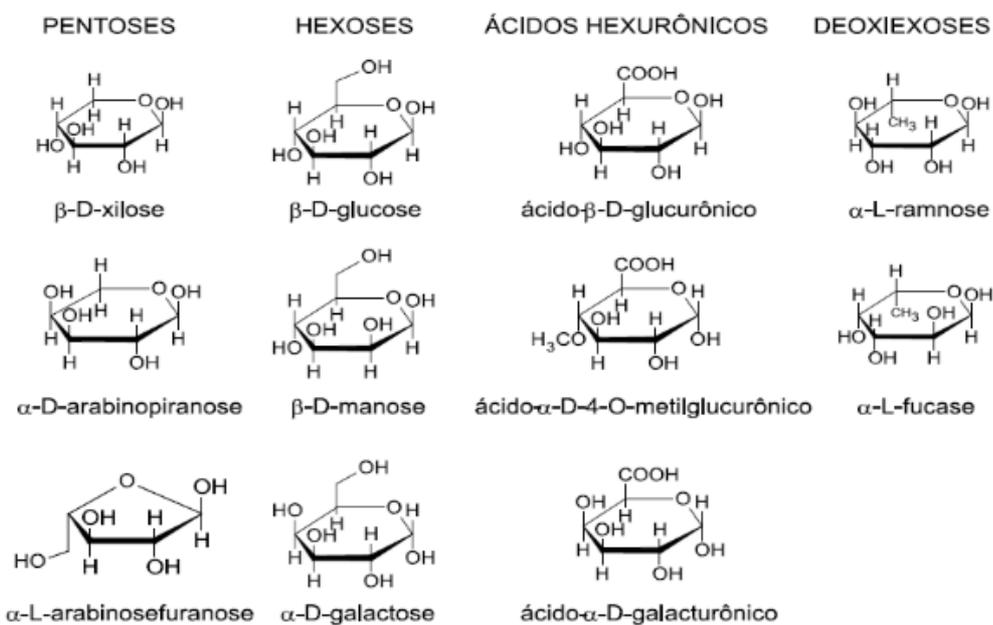
2.1.2. Hemicelulose

A hemicelulose é um polissacarídeo que constitui normalmente 20 – 40% em peso da biomassa vegetal, cuja composição pode aparecer condensada em proporções variadas, os quais estão intimamente associados à celulose nos tecidos das plantas. Diferentemente da celulose, as hemiceluloses não são quimicamente homogêneas, apresentam massa molar

baixa e não contém regiões cristalinas, sendo assim mais suscetíveis à hidrólise sob condições mais amenas e variam em suas estruturas e nas composições dependendo da fonte natural (HUBER et al. 2006).

Diversas unidades de açúcar que compõem as hemiceluloses são apresentadas na Figura 4, onde observa-se que as pentoses são unidades monoméricas que possuem cinco átomos de carbono, enquanto outras unidades como as hexoses contam com seis deles. A partir da condensação das pentoses obtêm as pentosanas e as hexosanas pela condensação de hexoses.

Figura 4: Açúcares que compõem as unidades de hemiceluloses



MORAIS et al. (2005)

De acordo com Ferreira et al. (2009), o mais abundante polímero da hemicelulose é o xilano, sendo um polímero da xilose ligada nas posições 1 e 4. A hemicelulose é amorfa e devido à sua natureza ramificada encontra-se intercalada às microfibrilas da celulose, dando elasticidade e impedindo que elas se toquem.

Segundo Saha (2003), as hemiceluloses de madeira dura contêm em sua estrutura xilanas, enquanto as hemiceluloses de coníferas contêm principalmente glicomananas.

As principais diferenças entre celulose e hemicelulose estão apresentadas na Tabela 3.

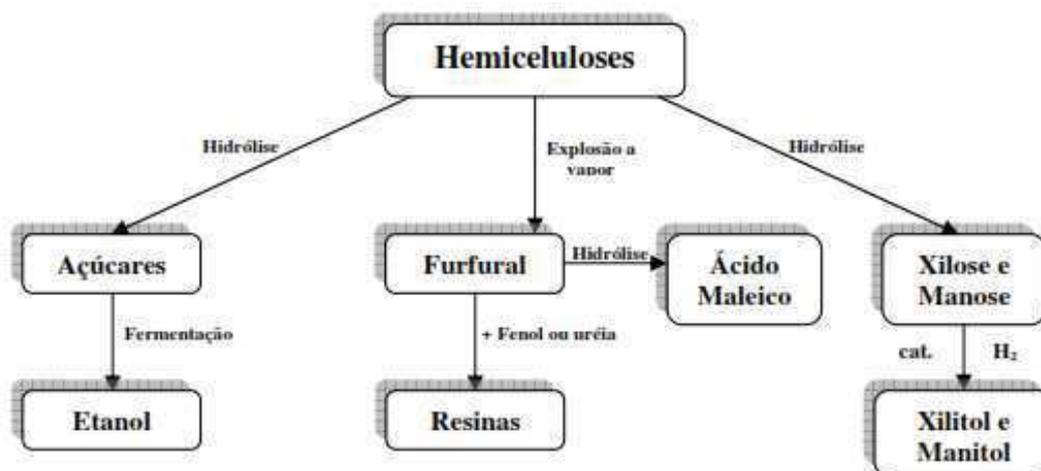
Tabela 3: Principais diferenças entre celulose e hemicelulose

Celulose	Hemicelulose
<ul style="list-style-type: none">- Consistem em unidades de glicose ligadas entre si (Natureza Homopolissacarídica)- Alto grau de polimerização (100 a 15.000)<ul style="list-style-type: none">- Forma arranjo fibroso- Apresenta regiões cristalinas e amorfas- É atacada lentamente por ácido inorgânico diluído a quente<ul style="list-style-type: none">- É insolúvel em álcalis	<ul style="list-style-type: none">- Consistem em várias unidades de pentoses e hexoses ligadas entre si (Natureza Heteropolissacarídica)- Baixo grau de polimerização (50 a 300)<ul style="list-style-type: none">- Não forma arranjo fibroso- Apresenta somente regiões amorfas- É atacada rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente<ul style="list-style-type: none">- É solúvel em álcalis

Fonte: PEREIRA JR. (2008)

Da hemicelulose podem ser extraídos vários componentes, como exemplificados na Figura 5.

Figura 5: Componentes extraídos da hemicelulose



SCHUCHARDT e RIBEIRO (2001)

Observa-se na Figura 5 que pela hidrólise das hemiceluloses em açúcares, os mesmos podem ser fermentados para obtenção de etanol. Se as hemiceluloses forem separadas por explosão a vapor (tratamento com vapor superaquecido e depressurização rápida), obtém-se como produto principal o furfural, dando origem as resinas com fenol ou ureia, ou pode ser hidrolisado para ácido malêico. Ainda pode ser produzido o xilitol por

hidrogenação catalítica, utilizado como umectante, adoçante, plastificante, aditivo de alimentos. E a partir de xilose, produz-se o manitol (adoçante, plastificante, secante) (SCHUCHARDT e RIBEIRO, 2001).

2.1.3. Lignina

A macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos depois da celulose é a lignina, e representa de 20 a 30% da massa total do material lignocelulósico. A lignina age como agente de enrijecimento, como material adesivo e como barreira contra degradação enzimática e/ou microbiana da parede celular, fornecendo um suporte estrutural à parede secundária das plantas (FENGEL e WEGENER, 1989).

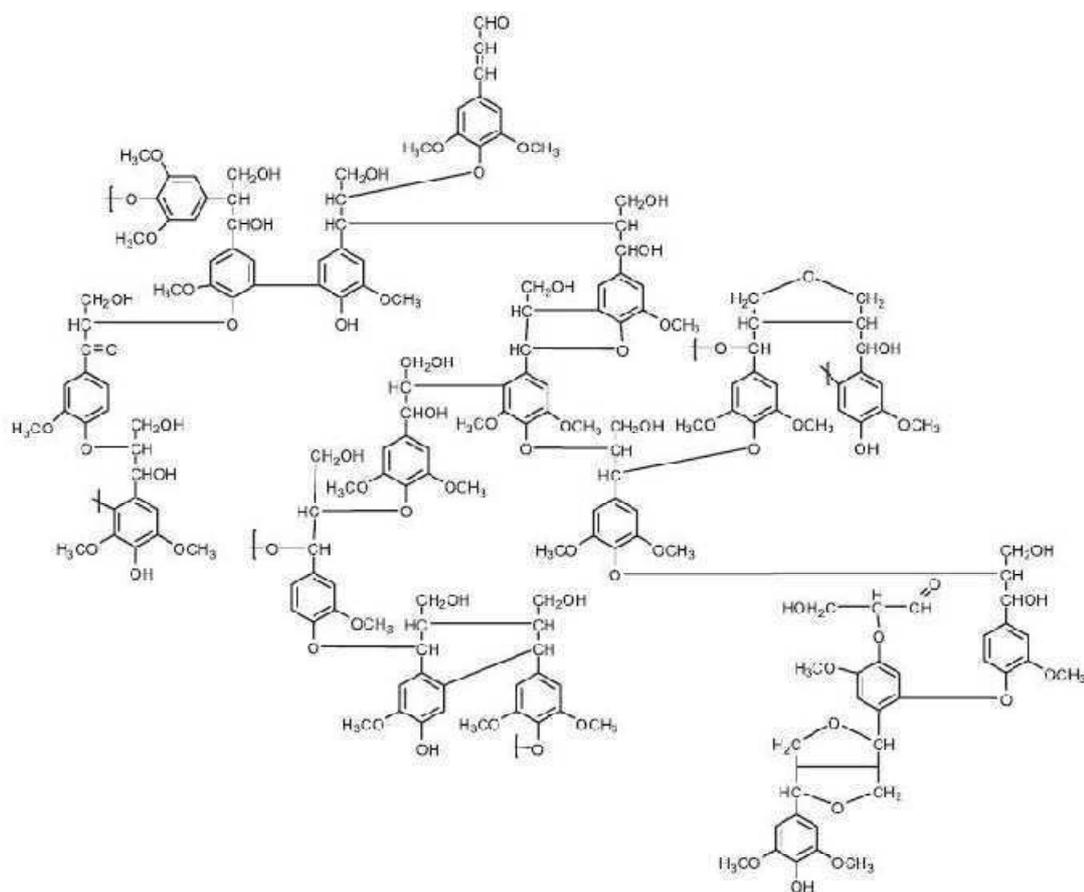
De acordo com Fasanella (2008), a parede celular lignificada pode ser vista como um complexo, com micro-fibrilas de celulose e hemicelulose, e a lignina como uma “matriz plástica” conferindo resistência ao material lignocelulósico e tornando também a parede celular vegetal hidrofóbica, permitindo o desenvolvimento eficiente dos tecidos para transporte de água.

A lignina é um polímero que possui uma estrutura polifenólica complexa, uma substância que vai sendo incorporada durante o crescimento do vegetal, sendo composta basicamente de unidades de fenilpropano. Pode ser definida como um material polifenólico amorfo com estrutura tridimensional baseada em três precursores monoméricos: os alcoóis p-cumarílico, coniferílico e sinapílico que geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas, respectivamente (DENCE e LIN, 1992).

A degradação da lignina apresenta grande importância econômica, tornando disponíveis substâncias de interesse na indústria, pecuária e na agricultura, como a vanilina e lignina oxidada, que são produzidos por processos oxidativos e os fenóis em geral que podem ser convertidos em éteres de arila e usados como aditivos para gasolina. A lignina pode ainda ser utilizada na produção de resinas fenólicas ou podem sofrer gaseificação com oxigênio, fornecendo gás de síntese, que é essencial na produção de metanol e pode ser utilizado como importante composto na produção de uma ampla variedade de produtos químicos (SCHUCHARDT e RIBEIRO, 2001).

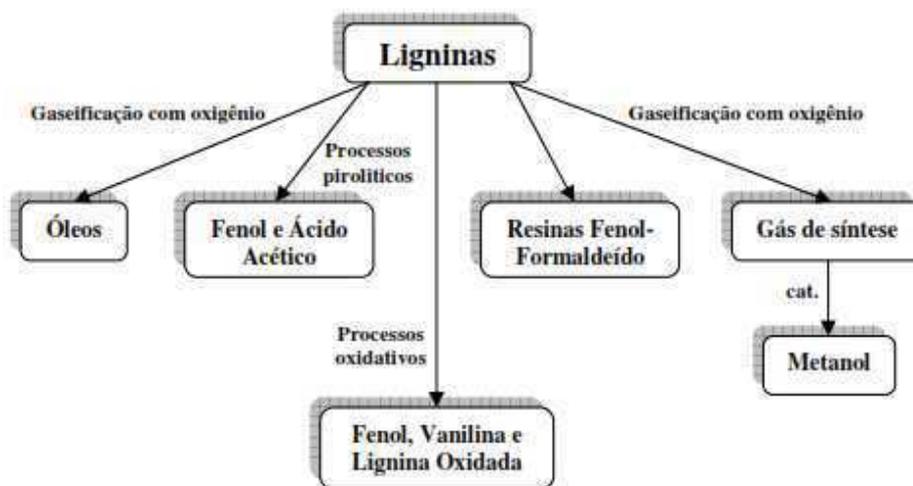
A Figura 6 representa a estrutura da lignina de eucalipto formada principalmente pela polimerização radicalar de unidades fenil-propano (álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico), enquanto na Figura 7 são apresentados alguns componentes extraídos da lignina.

Figura 6: Estrutura da lignina de eucalipto



SANTOS et al. (2012)

Figura 7: Componentes extraídos da lignina



SCHUCHARDT e RIBEIRO (2001)

2.2. Palma forrageira

A palma forrageira foi introduzida no Brasil em meados do século XIX para servir como suporte à criação de um inseto chamado cochonilha, do qual se extrai um corante de alto valor comercial (DATAMÉTRICA, 2004). Sendo está de origem mexicana, vindo a ser utilizada como forragem somente por volta de 1915.

A palma forrageira pertence à Divisão: Embryophyta, Sub-divisão: Angiospermea, Classe: Dicotyledoneae, Sub-classe: Archiclamideae, Ordem: Opuntiales e família das cactáceas; nesta família existem 178 gêneros com cerca de 2.000 espécies conhecidas. Todavia, nos gêneros *Opuntia* e *Nopalea* estão presentes as espécies de palma mais utilizadas como forrageiras (SILVA e SANTOS, 2007). A Figura 8 ilustra um plantio de palma forrageira tipo miúda.

Figura 8: Plantio de palma forrageira do tipo miúda



SEAGRI (2012)

A composição química da palma é variável segundo a espécie, variedade, idade do artigo, nível de fertilidade do solo, espaçamento e época do ano (FERREIRA, 2005).

Segundo Albuquerque (2004) a palma é uma forrageira diferente de todas as outras, a começar pela grande quantidade de água que concentra nos seus tecidos, cerca de 90%, apenas 10% da sua composição é constituída por matéria seca. Trata-se de excelente fonte de energia, rica em carboidratos não fibrosos, 61,79%, e nutrientes digestíveis totais, 62%.

Na Tabela 4 pode ser observada a composição químico-bromatológica de alguns tipos de palma forrageira.

Tabela 4: Composição químico-bromatológica da palma forrageira

Gênero	MS%	PB	FDN	FDA	CHT	CNF	CNE	MM
<i>Opuntia</i> (R)	10,40	4,20	---	---	---	---	---	---
<i>Opuntia</i> (G)	9,40	5,61	---	---	---	---	---	---
<i>Opuntia</i> (R)	10,93	4,21	---	---	---	---	---	---
<i>Nopalea</i> (M)	16,56	2,55	---	---	---	---	---	---
<i>Opuntia</i> (G)	12,63	4,45	26,17	20,05	87,96	61,79	---	6,59
<i>Opuntia</i> (G)	8,72	5,14	35,09	23,88	86,02	50,93	---	7,98
<i>Opuntia</i> (G)	7,62	4,53	27,69	17,93	83,32	55,63	---	10,21
<i>Nopalea</i> (M)	13,08	3,34	16,60	13,66	87,77	71,17	---	7,00
<i>Opuntia</i> (G)	10,70	5,09	25,37	21,79	78,60	53,23	---	14,24
<i>Opuntia</i> (G)	14,40	6,40	28,10	17,60	77,10	---	50,00	14,60
<i>Nopalea</i> (M)	12,00	6,20	26,90	16,50	73,10	---	47,40	18,60

MS - Matéria Seca; PB - Proteína Bruta; FDN - Fibra em Detergente Neutro; FDA - Fibra em Detergente Ácido; CHT - Carboidratos Totais; CNF - Carboidratos não-fibrosos; CNE - Carboidratos não-estruturais; MM - Matéria mineral; R - Palma redonda; G - Palma gigante; M - Palma miúda.

Fonte: SILVA e SANTOS (2007)

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4, valores para os teores de matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido são baixos na palma independente do gênero, no entanto, apresentam teores consideráveis de carboidratos totais, carboidratos não-fibrosos, carboidratos não-estruturais e matéria mineral, tornando-a uma boa fonte celulósica para produção de etanol.

No Nordeste do Brasil se encontram três tipos distintos de palma: gigante, redonda e miúda. A palma gigante, chamada também graúda, azeda ou santa, pertence à espécie *Opuntia ficus-indica* Mill. São plantas de porte bem desenvolvido e caule menos ramificado, o que lhes transmitem um aspecto mais ereto e crescimento vertical pouco frondoso; o cladódio pesa cerca de 1 Kg, apresentando até 50 cm de comprimento, forma oval-elíptica ou subovalada, coloração verde-fosco; as flores são hermafroditas, de tamanho médio, coloração amarelo-brilhante e cuja corola fica aberta na antese; o fruto é uma baga ovóide, grande, de cor amarela, passando a roxa, quando madura. Esta palma é considerada a mais produtiva e mais resistente às regiões secas, no entanto, é menos palatável e de menor valor nutricional (SILVA e SANTOS, 2007).

A palma redonda (*Opuntia sp.*) é originada da palma gigante. São plantas de porte médio e caule muito ramificado lateralmente prejudicando, assim, o crescimento vertical;

seu cladódio pesa cerca de 1,8 Kg, possuindo quase 40 cm de comprimento, de forma arredondada e ovóide. Apresenta grandes rendimentos de um material mais tenro e palatável que a palma gigante (SILVA e SANTOS, 2007).

A palma doce ou miúda é da espécie *Nopalea cochenilifera*. São plantas de porte pequeno e caule bastante ramificado, cujo cladódio pesa cerca de 350 g, possuem quase 25 cm de comprimento, forma acentuadamente obovada (ápice mais largo que a base) e coloração verde intenso brilhante; as flores são vermelhas e a corola permanece meio fechada durante o ciclo; o fruto é uma baga de coloração roxa. Comparando-a com as duas anteriores, esta é a mais nutritiva e apreciada pelo gado (palatável), porém apresenta menor resistência à seca (SILVA e SANTOS, 2007).

No semiárido nordestino a palma se consolidou como forrageira estratégica para diversos sistemas de produção pecuário, como um importante alimento para os rebanhos, principalmente, por sua alta resistência a seca, aliada a alta palatabilidade e produção de biomassa. É uma planta de enorme potencial produtivo e de múltiplas utilidades. Ela é a planta mais explorada e distribuída nas zonas áridas e semiáridas do mundo. Sua real dimensão produtiva ainda não foi plenamente conhecida no Nordeste, onde a maior área se concentra no agreste e no sertão dos estados de Alagoas e Pernambuco (LEITE, 2006).

De acordo com Menezes e Sampaio (2005), nas regiões nordestina a palma muitas vezes é a única forragem na estação seca e constitui um alimento estratégico nos anos secos, quando o crescimento de outras forragens é limitado pela precipitação pluvial, além de fornecer forragem verde, contribui ao atendimento de grande parte das necessidades de água para os animais.

De acordo com Almeida Neto et al. (2005), a cultura vegetal da palma se presta às mais diversas utilidades, por ser amplamente difundida, de fácil plantio, altamente resistente à seca. A palma forrageira pode ser utilizada na alimentação humana, alimentação animal, adesivos e colas, fibras para artesanato, papel, corantes, mucilagem para a indústria alimentícia e ornamental.

As utilizações e principais aplicações da palma forrageira estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Usos e aplicações potenciais da palma forrageira

Usos/Aplicações	Partes da Planta
Alimento humano	Frutos - frescos ou processados (passa, sucos, polpa, vinho, licor, compota, melaço, geléia, purês, adoçantes líquidos, etc.). Cladódios – jovens frescos (verduras), processados em salmoura ou em vinagre, pré-cozidos congelados, geléias, doces. Sementes – óleo comestível.
Alimento animal	Cladódios, frutos e sementes – forragem em pastejo ou cocho.
Agrícola	Planta – proteção e conservação dos solos (cercas-vivas, quebra-ventos, matéria orgânica).
Medicinal	Raízes – diurese. Cladódios – diarreia, diabetes, colesterol, anti-inflamatório. Fibras e mucilagem – obesidade. Flores – diurese e disenteria.
Energia	Cladódios – etanol, biogás e lenha. Frutos – etanol e biogás.
Cosmética	Cladódios – xampu, sabonetes, creme umectante, adstringentes, loções.
Outros	Planta – ornamental. Cladódios – adesivos, colas, pectinas, fibras, papel, anti-transpirante, corante, mucilagem, frutos e corantes.

Fonte: SEBRAE (2001)

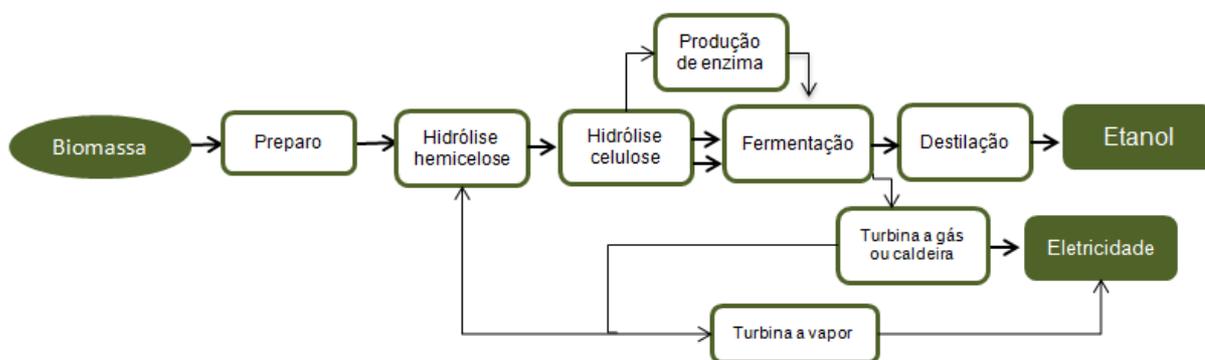
Outra utilidade da palma forrageira é como absorvedor de CO₂ da atmosfera. De acordo com Parry (1990), o aumento na plantação de palma forrageira pode ser uma estratégia para dificultar o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera, onde várias iniciativas de reflorestamento resultarão em depósitos de carbono reduzido e maior uso de combustíveis vegetais pode ajudar a substituir os combustíveis fósseis, que são os responsáveis pelas principais alterações da composição do ar atmosférico. Com o uso da palma forrageira para fins energéticos, os combustíveis dela derivados liberariam uma quantidade de CO₂ igual à absorvida da atmosfera durante seu crescimento.

2.3. Hidrólise de materiais lignocelulósicos

O bioetanol de segunda geração vem sendo produzido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos desde o século XIX, porém para produção de combustíveis, essa tecnologia tem sido proposta nos últimos 20 anos.

Os processos para a produção de biocombustível com a utilização de biomassa lignocelulósica, envolvem a hidrólise dos polissacarídeos e fermentação para a produção do bioetanol. Duas rotas são frequentemente empregadas para a hidrólise. A primeira é o uso de hidrólise ácida e a segunda é a hidrólise enzimática, ambas têm como objetivo a quebra da celulose e hemicelulose para se obter açúcares fermentáveis, para então produzir o etanol por meio de processos fermentativos alcoólicos da biotecnologia convencional (BASTOS, 2007). Uma configuração genérica é representada na Figura 9.

Figura 9: Esquema do processo de produção de etanol por meio de hidrólise da biomassa



Adaptado de SILVA (2010)

A maioria dos processos de hidrólise utilizados tende ao uso de enzimas microbianas, ou ácidos em concentrações variadas.

Tais materiais muitas vezes são resistentes à bioconversão e requerem um pré-tratamento para aumentar sua digestibilidade e tornar a celulose mais acessível à etapa de hidrólise, com a redução de sua cristalinidade e aumento da porosidade do material, através da ruptura do complexo celulose-hemicelulose-lignina. Estes processos podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação desses, o que dependerá do grau de separação requerido e do fim a que se destina o processo (RAMOS, 2000). Na Tabela 6 são apresentados alguns exemplos dos métodos de pré-tratamento mais utilizados.

Tabela 6: Exemplo dos métodos de pré-tratamentos mais utilizados

Processos	Descrição
Físico	
Explosão à vapor	A biomassa triturada é tratada com vapor (saturado, 160 a 260°C) seguida de uma rápida descompressão
Termohidrólise	Utiliza água quente e alta pressão (pressões acima do ponto de saturação) para hidrolisar a hemicelulose
Químicos	
Hidrólise ácida	Por meio do uso de ácidos sulfúrico, clorídrico ou nítrico, concentrados ou diluídos
Hidrólise alcalina	Pelo uso de bases como hidróxido de sódio ou cálcio
Organosolv	Uma mistura de um solvente orgânico (metanol, bioetanol e acetona, por exemplo) com um catalisador ácido (H ₂ SO ₄ , HCl) é usada para quebrar as ligações internas da lignina e da hemicelulose
Biológicos	Utilização de fungos para solubilizar a lignina. Geralmente é utilizada em combinação com outros processos
Combinados	
Explosão a vapor catalisada	Adição de H ₂ SO ₄ (ou SO ₄) ou CO ₂ , na explosão de vapor pode aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, diminuir a produção de compostos inibidores e promover uma remoção mais completa da hemicelulose
Afex (ammonia fibre explosion)	Explosão à amônia líquida a alta temperatura e pressão por um certo período de tempo, seguida de uma rápida descompressão
Explosão de CO ₂	Similar à explosão de vapor

Fonte: RABELO (2007).

2.3.1. Hidrólise ácida da celulose

Entre os métodos desenvolvidos para quebrar as moléculas de celulose e hemicelulose, a hidrólise ácida era o mais conhecido e amplamente utilizado. O processo de hidrólise da celulose com uso de concentrações baixas de ácido demanda o uso temperaturas e pressões altas para se alcançar taxas de reações aceitáveis, com baixos tempos de reações, por sua vez a hidrólise com ácido concentrado é feito a baixas

temperaturas, com tempos de reações mais longos. Seus principais problemas estão relacionados com a corrosão e a recuperação do ácido.

A dificuldade em atingir a região de reação na molécula de celulose pelos catalisadores é o fator ponderante no processo de hidrólise. A forte ligação da celulose com a hemicelulose e a lignina se caracteriza como um dos fatores que controlam esse acesso. Outro fator crítico é a presença de pontes de hidrogênio entre grupos hidroxílicos de diferentes unidades de glicose na estrutura macromolecular da celulose (RAO, 2006).

A hidrólise ácida da biomassa lignocelulósica produz principalmente xilose a partir da xilana, mantendo as frações celulose e lignina praticamente inalteradas. A xilana é mais susceptível a hidrólise por tratamentos ácidos leves devido as suas estruturas amorfas. Já a celulose necessita de condições de hidrólise mais severas, considerando-se sua natureza cristalina (RAHMAN, 2007).

Durante a hidrólise ácida vários compostos que podem funcionar como inibidores da fermentação são originados devido às altas temperaturas e condições ácidas. Esses inibidores dependem da matéria-prima utilizada e se agrupam em três categorias: derivados do furano, ácidos alifáticos de baixa massa molar e derivados fenólicos (ROSSELL, 2006). As reações da hidrólise ácida podem ser representadas por:

❖ Etapa 01:

Pentose → pentose

Pentoses → furfural

❖ Etapa 02:

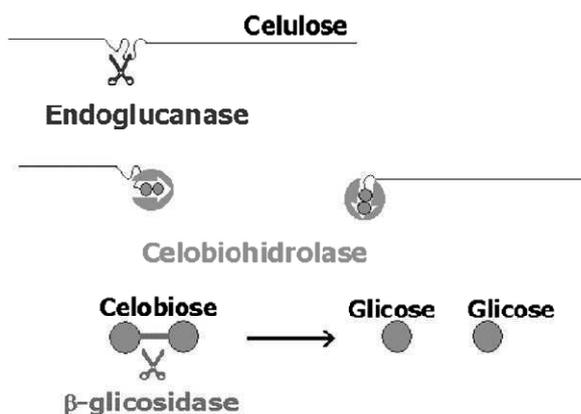
Celulose → hexoses

2.3.2. Hidrólise enzimática da celulose

A hidrólise enzimática da celulose é catalisada por enzimas altamente específicas que são chamadas de celulasas. Na realidade, a hidrólise completa da celulose requer uma ação de um complexo enzimático composto por pelo menos três grandes grupos de celulasas atuando em sinergia: endoglucanases, que clivam randomicamente as ligações internas da região amorfa, liberando oligossacarídeos com terminações redutoras e não redutoras livres; exoglucanases, subdivididas em celobiohidrolases, que são responsáveis pela hidrólise dos terminais redutores e não redutores, e glucanohidrolases, que são capazes de liberar moléculas de glicose diretamente dos terminais do polímero; e β -glucosidases, que hidrolisam a celobiose e oligossacarídeos solúveis de baixo grau de

polimerização a glicose. (ARANTES e SADDLER, 2010). Na Figura 10 é apresentada uma representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre a celulose com geração de glicose.

Figura 10: Representação esquemática da ação das celulases sobre a celulose para geração de glicose.



OGEDA e PETRI (2010)

Considerando as características estruturais da celulose, verifica-se que o modo de ação das enzimas influencia a taxa de reação. A susceptibilidade da celulose ao ataque enzimático é determinada pela acessibilidade dos sítios de ligação a celulose, o que determina a subsequente adsorção da enzima ao substrato sólido. Dessa forma a adsorção das enzimas celulases e a concentração do complexo enzima-substrato são apreciadas como os passos cruciais na hidrólise enzimática de celulose, considerando-se essa reação de hidrólise de grande complexidade. Assim muitos estudos ainda estão sendo realizados a fim de se encontrar a melhor rota tecnológica (SILVA, 2010).

Segundo Robertson (2006), a natureza do substrato a ser utilizado é um fator que pode contribuir ou limitar a ação da enzima, assim como a extensão de hidrólise também depende do tipo de enzima, quantidade de atividade da enzima, tempo de reação, temperatura e presença ou ausência de inibidores, entre outros fatores.

Na Tabela 7 pode-se observar alguns pontos que diferem a hidrólise ácida com relação à hidrólise enzimática.

Tabela 7: Comparação da hidrólise ácida e enzimática

Parâmetros	Hidrólise 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 dos detalhes do processo	Depende do material e dos detalhes do processo
Formação de subprodutos	Provável formação	Não há formação

Fonte: KRISHNA et al., (2000).

Embora os processos de hidrólise ácida estejam mais desenvolvidos tecnologicamente, 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, uma vez que a hidrólise enzimática é usualmente conduzida em condições suaves como pH e temperatura, além de não apresentar problemas de corrosão nos equipamentos (RABELO, 2007).

2.4. Fermentação alcoólica

Produtos de fermentação são usados desde a Antiguidade. Há registros que comprovam o uso de alimentos fermentados pelos sumérios, egípcios antigos, assírios e babilônios. A produção de bebidas pela fermentação de grãos de cereais já era conhecida antes do ano 6.000 a.C. (VILLEN, 2009).

De acordo com ROCHA (2010), atribui-se a Bechner, no século XVIII, a afirmação de que somente os líquidos açucarados são capazes de entrar em fermentação alcoólica. Ao contrário do que se pensavam alguns pesquisadores que o antecederam, para Bechner o álcool se formava durante o processo de fermentação, julgando erradamente, no entanto, a necessidade de ar para causar o fenômeno que ele considerava semelhante à combustão. Os primeiros estudos envolvendo o mecanismo da fermentação alcoólica relacionavam apenas à formação dos produtos iniciais e finais. Foi Black que primeiro postulou, no século XVIII, que o álcool etílico e gás carbônico eram os únicos produtos formados do açúcar na fermentação alcoólica.

Lavoisier, em 1798 foi o primeiro a efetuar o estudo quantitativo da fermentação alcoólica. Coube a Pasteur, a partir de 1857, a explicação clara sobre a natureza da fermentação alcoólica, atribuindo-a a seres vivos, as leveduras, como agentes causais. Segundo ele, 100 partes de sacarose proporcionam 105,4 partes de açúcar invertido, que, por sua vez, produzem 51,1 partes de etanol, 49,4 partes de gás carbônico, 3,2 partes de glicerol, 0,7 parte de ácido succínico e uma parte de outras substâncias (ROCHA, 2010). A partir daí, e principalmente durante as primeiras décadas de 1900, as pesquisas culminaram com a elucidação das reações enzimáticas responsáveis pela transformação química do açúcar em etanol e gás carbônico no interior da levedura (LIMA et al., 2001).

2.4.1 Bioquímica da fermentação alcoólica

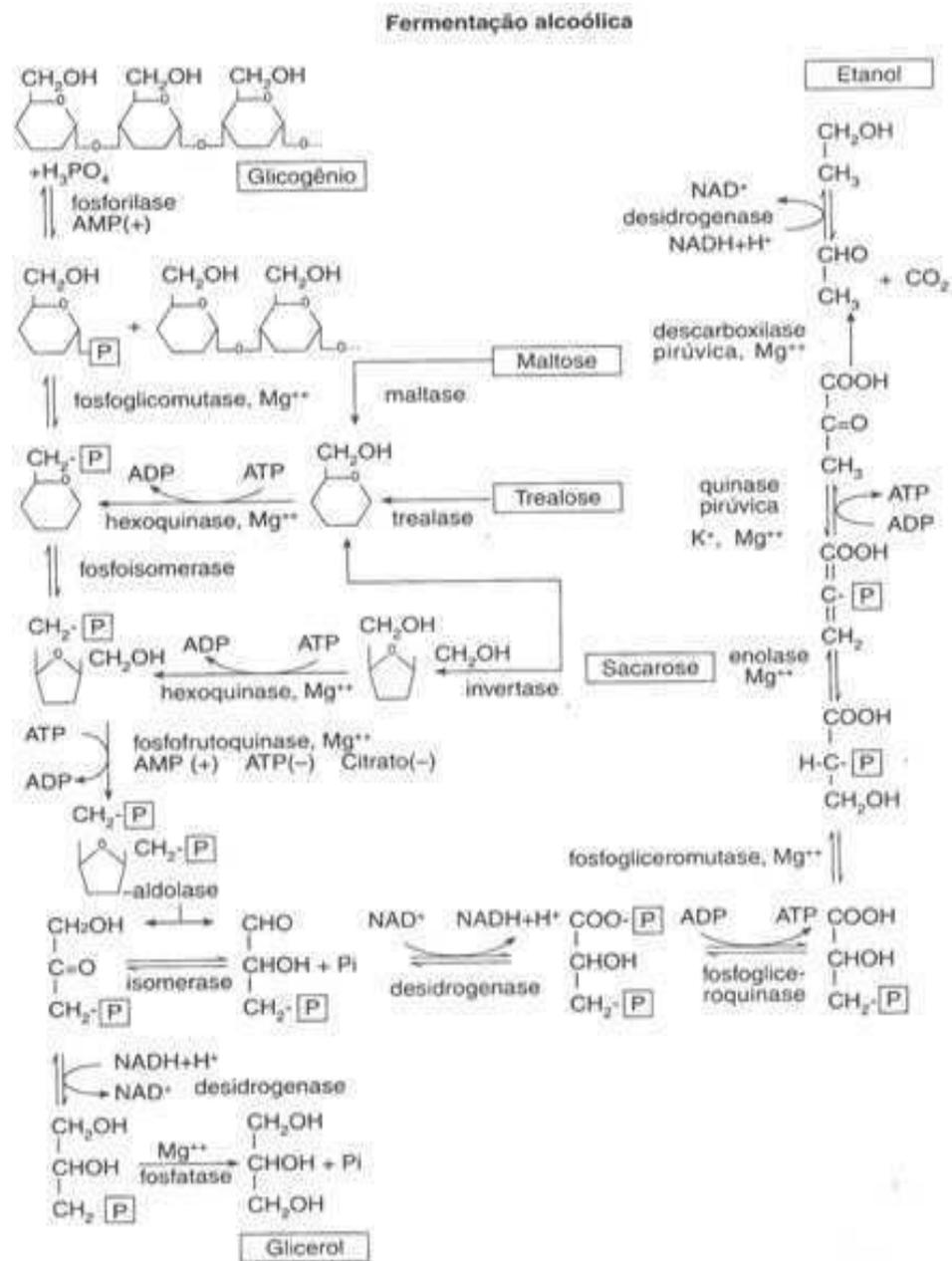
A fermentação alcoólica é a reação de leveduras sobre açúcares fermentescíveis contidos em uma solução. É um processo biológico no qual a energia fornecida por reações de oxidação parcial pode ser utilizada para o crescimento de leveduras e a oxidação parcial anaeróbia da hexose na produção de etanol e CO₂ (LIMA e MARCONDES, 2002).

A transformação da sacarose em etanol e CO₂ envolve 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica, conforme apresentado na Figura 11. Tal aparato enzimático está confinado no citoplasma celular, sendo, portanto nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa (LIMA et al., 2001).

Segundo Lima et al. (2001), os carboidratos considerados substratos para a fermentação, tanto podem ser endógenos, constituintes das leveduras, como glicogênio e trealose, e exógenos, os ofertados, presentes no meio fermentativo, que são a sacarose, glicose e frutose.

A principal rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica é a glicólise, na qual a glicose é convertida a piruvato, onde este é convertido em etanol e CO₂ em um processo de duas etapas. Na primeira etapa, o piruvato é descarboxilado em uma reação irreversível catalisada pela enzima descarboxilase piruvato. Esta reação é uma descarboxilação simples e não envolve a oxidação do piruvato. Na segunda etapa, o acetaldeído é reduzido a etanol através da ação da enzima álcool desidrogenase, com o poder redutor fornecido pelo NADH derivado da desidrogenação do gliceraldeído 3-fosfato (ROCHA, 2010).

Figura 11: Sequência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por *Saccharomyces cerevisiae*



LIMA et al. (2001)

De acordo com os relatos de Tosetto (2002), considera-se a levedura como entidade viva independente, onde realiza a fermentação de açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária a sua sobrevivência, sendo o etanol apenas um subproduto desse processo. Dessa maneira, se o homem pretende beneficiar-se dessa habilidade metabólica, ele deve buscar os conhecimentos que lhe permitam propiciar às leveduras, condições ideais para as mesmas aumentarem a eficiência na produção de etanol.

2.4.2 Fatores que afetam a fermentação

Durante a fermentação alcoólica diversos fatores podem afetar seu rendimento, e por consequência, a eficiência da conversão de açúcares em etanol. Segundo Lima et al. (2001) pode-se citar:

a) Agente de fermentação: o desempenho do processo fermentativo é enormemente afetado pelo tipo de levedura que o executa. A levedura da fermentação alcoólica é a *Saccharomyces cerevisiae*, na qual foram selecionadas várias linhagens, tidas por muito tempo como espécies. Entre as espécies é muito importante a escolha de linhagens selecionadas e aclimatadas para a realização da fermentação alcoólica e que devem apresentar certos requisitos para a boa eficiência da fermentação, como a velocidade de fermentação, resistência ao álcool, eficiência de conversão, resistência ao pH, anti-sépticos e estabilidade genética;

b) Nutrição Mineral e Orgânica: as leveduras, organismos saprófitas, exigem uma fonte de carbono elaborada, glicose ou outro açúcar, que fornece a energia química e o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares, constituídas predominantemente de carbono, oxigênio e hidrogênio. Algumas vitaminas também são exigidas, e o meio deve igualmente, fornecer alguns nutrientes minerais, tais como fósforo, nitrogênio, enxofre, potássio, zinco, cobre, magnésio, iodo, cálcio, cobalto e outros elementos com quantidades diminutas;

c) Temperatura: as leveduras são ditas como mesófilas, onde apresentam temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol na faixa de 26 a 35 °C. À medida que a temperatura se eleva, aumenta a velocidade de fermentação, mas favorece a contaminação bacteriana, ao mesmo tempo que a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol. Além disso, temperaturas elevadas permitem maior perda de etanol por vaporização em dornas abertas;

d) pH: as fermentações se desenvolvem em ampla faixa de valores de pH, sendo adequada entre 4 e 5. Os valores de pH dos mostos industriais geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5, com boa capacidade tamponante. Fermentações conduzidas em meios mais ácidos resultam em maiores rendimentos em etanol pelo fato de restringir o crescimento do fermento, com a consequente redução da produção de glicerol, ao mesmo tempo que reduz a contaminação bacteriana;

e) Concentrações de açúcares: concentração de açúcares elevada aumenta a velocidade de fermentação, a produtividade e, dentro de certos limites, acarreta menor crescimento do fermento e menor formação de glicerol por unidade de substrato processado. Entretanto, elevados teores de açúcar acarretam um estresse osmótico da levedura, de tal forma que existe, dependendo do processo de fermentação, uma faixa de concentração considerada ideal;

f) Concentração de inóculo: maiores concentrações de levedura na dorna permitem fermentações mais rápidas, com maior produtividade e com maior controle sobre as bactérias contaminantes, além de restringir o crescimento da própria levedura. Por outro lado, elevado teor de levedura exige energia de manutenção maior, isto é, maior consumo de açúcar para manter as células vivas, resultando em maior competição pelos nutrientes do meio, minerais e vitaminas, diminuindo a viabilidade do fermento.

2.5. Estado da arte

Esta seção apresenta os resultados presentes na literatura referentes às matérias-primas com potencial utilização para produção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos, verificando-se a caracterização e os processos envolvidos para cada uma delas.

Oliveira (2012) estudou a otimização do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino a alta concentração de sólidos para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, este inicialmente com teores de α -celulose, hemicelulose e lignina de 38,09, 18,91 e 23,02%, respectivamente e, que após a otimização do pré-tratamento, apresentou composição de α -celulose, hemicelulose e lignina de 37,55, 14,07 e 8,85%, respectivamente, o que resultou em rendimentos de conversão de celulose em glicose de até 95,38%.

Após a caracterização físico-química e bioquímica do farelo da palma forrageira redonda (*Opuntia ficus*), destinado a alimentação de ruminantes Silva et al. (2011) mostrou em seus resultados que a palma em estudo apresentava 10,1% de matéria seca cerca de 90% de umidade, a qual era composta por 15,68% de matéria mineral, 5,1% de proteína bruta, 0,96% de extrato etéreo, 28,56% de fibra em detergente neutro, 22,02% de fibra em detergente ácido e 49,7% de carboidratos não fibrosos. Segundo o autor, a palma forrageira redonda (*Opuntia ficus*) é rica em carboidratos não fibrosos, importante fonte de energia.

Analisando-se o pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, Rueda (2010) obteve em sua caracterização teores de α -celulose, hemicelulose e lignina correspondentes à 37,35, 23,66 e 25,1%, respectivamente. Após o pré-tratamento desses materiais com H_2SO_4 e H_3PO_4 que sofreram processo de deslignificação com NaOH, os residuais para as melhores condições de pré-tratamento foram teores de α -celulose, hemicelulose e lignina em torno de 47,82, 24,83 e 11,56%, respectivamente, o que ocasionou em rendimentos da hidrólise enzimática de até 91,73%. Segundo a autora o desempenho da hidrólise enzimática melhorou significativamente quando o bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico e fosfórico foi deslignificado com hidróxido de sódio, obtendo-se rendimentos elevados na produção de glicose.

Rocha (2010) estudou a produção de bioetanol a partir de pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) por fermentação submersa, inicialmente este com teores de α -celulose (20,9%), hemicelulose (16,3%) e lignina (33,6%). O bagaço do pedúnculo de caju no trabalho citado foi pré-tratado, um pré-tratamento utilizando H_2SO e outro com $Ca(OH)_2$, onde os resultados demonstraram o potencial do pedúnculo de caju (suco e bagaço) como nova fonte de carbono para produzir etanol por *S. cerevisiae*, obtendo-se rendimentos na fermentação alcoólica de 0,49 g de etanol/g de substrato.

Avaliando e otimizando os pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com teores de α -celulose (40,5%), hemicelulose (24,5%) e lignina (26,4) para a produção de etanol de segunda geração, Rabelo (2010) realizou pré-tratamentos com $Ca(OH)_2$, onde obteve uma composição no material pré-tratado de α -celulose (40,3%), hemicelulose (12,4%) e lignina (8,1%) e com H_2O_2 , obtendo-se uma composição α -celulose (39,9%), hemicelulose (5,8%) e lignina (3,7%). A otimização realizada nos pré-tratamentos proporcionou conversões de 90,8% e 100% da celulose presente no material pré-tratado com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio, respectivamente.

Na determinação dos dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio, Fuentes (2009) obteve teores, antes do pré-tratamento, da α -celulose (37,35%), hemicelulose (23,66%) e lignina (25,10%), enquanto que após o pré-tratamento esses valores passaram a 35,50, 12,53 e 9,16%, respectivamente, resultando em rendimentos da hidrólise enzimática de até 99,37% operando-se com baixa concentração de sólidos (1%).

Mendonça (2009) estudando uma contribuição ao estudo da fermentação alcoólica realizou fermentações em reatores batelada com o objetivo de avaliar altas concentrações iniciais de sacarose utilizando a cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* (Y-904),

variando a concentração de sacarose e leveduras ao longo dos experimentos. Os resultados mostraram bom desempenho da cepa industrial em estudo, obtendo-se fator de conversão da glicose em etanol de 0,49 g de etanol/g de glicose, o que corresponde a aproximadamente 96% de rendimento. Segundo o autor, os resultados obtidos demonstraram que a fermentação alcoólica em altas concentrações iniciais de sacarose pode ser um fator interessante do ponto de vista industrial, podendo levar a bons rendimentos em pequenos intervalos de tempo de processo.

Pitarelo (2007) avaliando a susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática, encontrou teores de α -celulose, hemicelulose e lignina para o bagaço de cana em torno de 42, 22,7 e 31%, respectivamente, enquanto para a palha esses valores foram 34, 18 e 40%, respectivamente. A respectiva autora realizou o pré-tratamento a vapor de seus materiais e constatou que após este procedimento, esses se tornaram mais susceptíveis à hidrólise enzimática, obtendo-se rendimentos de até 65,5% de conversão da celulose em glicose.

Capítulo 3

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados para o desenvolvimento da pesquisa e as diferentes metodologias empregadas em cada experimento realizado.

3.1. Matéria-prima

A matéria-prima utilizada foi a palma forrageira tipo gigante (*Opuntia ficus-indica* Mill) doada gentilmente pelo proprietário de uma fazenda localizada no Distrito de Caluête, Município de Boa Vista, cariri paraibano.

3.2. Coleta e seleção

Consistiu em coletar a palma na propriedade, fazer sua seleção para evitar a utilização de matérias-primas que já se encontrassem em estado de degradação e levá-la ao local de processamento (Laboratório de Engenharia Bioquímica – LEB).

3.3. Lavagem

Realizou-se a lavagem superficial dos cladódios da palma com água corrente para eliminar as sujeiras mais grosseiras a eles aderidas (materiais sólidos como areia e pedras).

3.4. Secagem

Os cladódios da palma foram cortados em pequenos pedaços, colocados em bandejas de aço inox perfuradas e levados a um secador de leito fixo para retirada da maior parte da umidade inicial.

Após a retirada de maior parte da umidade, os cladódios foram colocados em bandejas de plástico e levados à estufa com circulação de ar, por aproximadamente 72 h, na temperatura de 65 °C para obtenção da matéria seca, pesando-se o material até massa constante. Após a secagem, esse material foi triturado em liquidificador comercial para reduzir sua granulometria, expondo, dessa forma, ainda mais a celulose ao meio ácido ou enzimático da hidrólise.

O material obtido após a secagem e trituração foi armazenado em recipientes de plásticos hermeticamente fechados até sua utilização, diminuindo assim, o risco em adsorção de umidade externa e possível contaminação.

3.5. Caracterização

A metodologia utilizada foi baseada nas normas TAPPI citadas por Morais et al. (2010), onde coletou-se, aleatoriamente, uma pequena quantidade da palma seca para se

realizar a caracterização, que consistiu em analisar umidade, cinzas, extrativos, lignina, holocelulose, α -celulose e hemicelulose.

3.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para esta análise, as amostras dos materiais lignocelulósicos foram fixadas com fita adesiva de carbono dupla face condutora convencional em suporte de alumínio (stubs) e depois foram metalizadas com uma liga de ouro/paládio de 10 nm em metalizador Quick Coater SC-701 (Sanyu Electron, Tóquio, Japão) e, posteriormente, as amostras foram mantidas em dessecador até o momento da análise.

As microfotografias de MEV foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura (Superscan SSX-550, Shimadzu) com detector OXFORD (elétron secundário) a uma potência do feixe de elétrons de 20 kV (equipamento disponível na Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais – Laboratório de Caracterização Microestrutural II/UAEM/UFCG), utilizando-se o software LEO, versão 3.01. As amostras foram dispostas de forma que fosse possível observar as modificações superficiais das fibras dos materiais.

As microscopias eletrônicas de varredura foram realizadas na fibra in natura com ampliação de faixa de 100 a 3.000 vezes.

3.7. Hidrólise ácida

A hidrólise ácida da palma forrageira foi conduzida em um reator de aço inox da marca MAITEC FORNOS modelo INTI, com controlador de pressão e temperatura, de capacidade máxima 750 mL conforme mostrado na Figura 12.

Figura 12: Reator de aço inoxidável utilizado na hidrólise ácida



A metodologia utilizada na palma forrageira consistiu em uma adaptação das metodologias empregadas na hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar (ROSSELL, 2006; BASTOS, 2007) e na hidrólise ácida da casca da aveia (TAMANINI et al., 2004).

Um planejamento fatorial 2^3 foi empregado com três experimentos no ponto central, para verificar a influência das variáveis de entrada (temperatura do processo (T), concentração de ácido sulfúrico (C) e relação massa seca da palma forrageira/ácido (R)) sobre a eficiência (concentração de glicose). Neste processo foi estabelecido um tempo reacional de 60 minutos devido experimentos preliminares demonstrarem que para tempos reacionais maiores não houve mais modificação na concentração dos açúcares.

Na Tabela 8 é apresentada a matriz de planejamento fatorial completo e na Tabela 9 os níveis das variáveis de entrada codificados e reais.

Tabela 8: Matriz do planejamento fatorial 2^3

Experimento	Temperatura (T)	Concentração de ácido (C)	Relação massa seca de palma/ácido (R)
1	- 1	- 1	-1
2	+ 1	- 1	-1
3	- 1	+ 1	-1
4	+ 1	+ 1	-1
5	- 1	- 1	+1
6	+ 1	- 1	+1
7	- 1	+ 1	+1
8	+ 1	+ 1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Tabela 9: Níveis codificados e reais das variáveis independentes para o planejamento fatorial 2^3

Variáveis	-1	0	+1
Temperatura (°C)	140	160	180
Concentração de ácido (% v/v)	1,5	2,25	3
Relação massa seca de palma/ácido (m/v)	1:9	1:11	1:13

Para a realização dos experimentos do planejamento experimental fixou-se a quantidade de massa seca da palma em 10 g e calculou-se a quantidade do ácido necessária para atender à outra variável independente (relação massa seca da palma/ácido)

3.7.1. Concentração de glicose

A concentração de glicose na hidrólise ácida e hidrólise enzimática foi determinada pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde coletou-se 1 mL da amostra, em seguida transferiu-se para um balão de 25 mL, completando o volume com água ultra-pura (Resistividade 18,2 Mohm.cm). Após a diluição, a solução foi filtrada em filtros para seringa com diâmetro de 0,20 µm.

Os dados do cromatógrafo (Figura 13) e as condições das operações foram as seguintes:

- Cromatógrafo Líquido equipado com uma bomba modelo ProStar 210 (Varian);
- Injetor manual modelo 7725 (Rheodyne) com “loop” de 20 µL;
- Detector de índice de refração modelo ProStar 355 (Varian);
- Coluna Hi-Plex H 8 µm (300 x 7,7 mm);
- Temperatura da coluna de 60 °C;
- Fase móvel: água miliQ com vazão de 0,6 ml/min;
- Tempo de análise: 60 minutos

Figura 13: Cromatógrafo líquido de alta eficiência



3.8. Hidrólise enzimática

Para a hidrólise enzimática da palma forrageira (palma *in natura*) foi realizado um planejamento fatorial 2^2 verificando-se a influência das variáveis de entrada (carga enzimática e relação massa seca de palma/extrato enzimático) sobre a resposta (rendimento

de conversão da celulose em glicose) e, para cada experimento, foi realizada uma cinética para verificar qual o melhor tempo reacional para este processo.

Na Tabela 10 é apresentada a matriz de planejamento fatorial completo e na Tabela 11 os níveis das variáveis de entrada codificados e reais.

Tabela 10: Matriz do planejamento fatorial 2^2

Experimento	Carga enzimática	Relação massa seca de palma/extrato enzimático
1	- 1	-1
2	+ 1	-1
3	- 1	+1
4	+ 1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Tabela 11: Níveis codificados e reais das variáveis independentes para o planejamento fatorial 2^2

Variáveis	-1	0	+1
Carga enzimática (FPU/g)	10	17,5	25
Relação massa seca de palma/extrato enzimático (% m/v)	2	3	4

A hidrólise foi realizada em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo: a palma seca, uma preparação enzimática de celobiohidrolases (CBHs), endo-1,4-beta-glucanases (EGS) (Celluclast 1.5L - Novozyme, 8,21 FPU/mL) e tampão de citrato de sódio nas condições do planejamento experimental, 0,28 g de beta-glicosidase – Powercell, esta gentilmente cedida pela Prozyn – Bio Solutions for Life e 0,4% (v/v) de solução de tetraciclina (10 mg/mL em 70% de etanol) para prevenir o crescimento microbiano durante a hidrólise. Esta mistura foi mantida em uma incubadora shaker MARCONI MA-420 (Figura 14) sob agitação de 150 rpm e temperatura de 50°C.

Figura 14: Incubadora shaker



Concluída a hidrólise enzimática, o seu rendimento foi calculado por meio da Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{quantidade de glicose produzida (g/L)}}{\text{quantidade teórica de glicose produzida (g/L)}} \cdot 100 \quad (1)$$

Em que, baseado na reação estequiométrica de conversão de celulose em glicose, a quantidade teórica de glicose produzida (g/L) = quantidade de celulose no material (g/L) · 1,11 (g de glicose/g de celulose).

Os níveis reais das variáveis carga enzimática, relação massa seca de palma/extrato enzimático, concentração de tetraciclina e condições da hidrólise foram baseados nos trabalhos de Silva (2010), Fuentes (2009) e Rocha (2010).

3.8.1 Preparação enzimática utilizada na hidrólise

A preparação enzimática empregada para a sacarificação da palma forrageira foi composta 100 mL da enzima Celluclast 1.5 L da Novozyme avolumados a 1000 mL em balão volumétrico com tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8, sendo homogeneizada cuidadosamente para evitar a formação de bolhas, resultando em uma atividade enzimática final de 8,21 FPU/mL.

A Equação 2 apresenta a expressão para o cálculo da carga enzimática, onde fixaram-se os valores da carga conforme o planejamento (Tabela 11), da massa de palma (3 g) e calcularam-se os volumes da preparação enzimática (8,21 FPU/mL) e de tampão, também para atender as variáveis de entrada do planejamento com relação a massa seca de palma/extrato enzimático de 2, 3 e 4%.

$$\text{FPU/g} = \frac{V_E (\text{mL}) \cdot A(\text{FPU/mL})}{M(\text{g})} \quad (2)$$

Em que:

FPU/g é a carga enzimática;

V_E é o volume da preparação enzimática;

A é a atividade da preparação enzimática;

M é a massa seca de palma.

A Tabela 12 apresenta as quantidades de palma, preparação enzimática (Celluclast 1.5L), tampão citrato de sódio e tetraciclina utilizadas em cada experimento do planejamento experimental.

Tabela 12: Quantidades de palma, preparação enzimática (Celluclast 1.5L), tampão citrato de sódio e tetraciclina utilizadas em cada experimento do planejamento experimental

Experimento	Palma (g)	Celluclast 1.5L (mL)	Tampão (mL)	Tetraciclina (mL)
1	3	3,65	146,35	0,6
2	3	9,14	140,86	0,6
3	3	3,65	71,35	0,3
4	3	9,14	65,86	0,3
5	3	6,39	93,61	0,4
6	3	6,39	93,61	0,4
7	3	6,39	93,61	0,4

3.8.2 Determinação da atividade enzimática total (FPU/mL)

O método realizado para determinar a atividade enzimática total foi descrito por Ghose (1987) utilizando-se papel de filtro Whatman #1 como substrato.

Tiras de papel de filtro Whatman #1 pesando 50 mg foram recortadas, enroladas e adicionadas a tubos de ensaio pré-encubados a 50 °C contendo 1 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M (pH = 4,8).

A esta mistura foram adicionados 0,5 mL do extrato enzimático em, no mínimo, três diluições diferentes e suficientes para produzirem exatamente 2 mg de glicose. Após uma hora de incubação interrompeu-se a hidrólise com a adição de 3 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e colocou-se o meio em água fervente por aproximadamente 5 minutos, onde em seguida foi resfriado em banho de gelo. Logo após foram adicionados 20 mL de água destilada e homogeneizados para facilitar a leitura da absorbância.

A absorvância da solução foi medida em 540 nm e a concentração de glicose determinada com auxílio de uma curva de calibração onde a glicose foi utilizada como padrão.

A partir destes valores construiu-se um gráfico semilog relacionando as diluições da enzima e suas respectivas concentrações de açúcares redutores (determinadas por DNS), que serviu para determinar, por regressão linear, a diluição da enzima necessária para liberar 2 mg de glicose no meio reacional.

A atividade enzimática foi realizada em FPU/mL (Unidades de Papel de Filtro) usando as Equações 3 e 4:

$$\text{concentração} = \frac{1}{\text{diluição}} \left(\frac{\text{volume da enzima na diluição}}{\text{volume total da diluição}} \right) \quad (3)$$

$$\text{FPU} = \frac{0,37}{\text{concentração da enzima para liberar 2 mg de glicose}} \text{unidades} \cdot \text{ml}^{-1} \quad (4)$$

3.9. Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica foi realizada com o licor hidrolisado nas melhores condições estabelecidas pelo planejamento fatorial.

Para a realização da fermentação alcoólica, onde se realizou um estudo cinético analisando-se a concentração de glicose, etanol e células, 400 mL do licor hidrolisado foram colocados em um frasco erlenmeyer de 1000 mL, adicionado de nutrientes à base de nitrogênio e fósforo (Nitrofós) em concentrações de 0,6 g/L de licor e levedura seca (Y-904) em concentrações de 2 g/L de licor, ambos doados pela CBB Biomassa e Bioprocesso LTDA e enviado à incubadora shaker, controlando-se a temperatura em 32 °C e uma agitação de 170 rpm, conforme mostrado na Figura 15.

Figura 15: Fermentação alcoólica



As concentrações de nutrientes, leveduras, bem como temperatura e agitação basearam-se no trabalho de Leão (2014).

As concentrações de glicose e etanol foram determinadas, também, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência nas mesmas condições operacionais mencionadas nas hidrólises.

3.9.1. Determinação da concentração de células

A determinação da concentração celular resultante da fermentação foi realizada em espectrofotômetro da marca PHTONICS BEL SP 2000 UV, pela determinação da absorbância a 610 nm das células ressuspensas em água destilada.

Para preparação da amostra destinada à leitura no espectrofotômetro, 1,5 mL do meio fermentativo foram colocados em tubos de eppendorf e centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e determinaram-se as concentrações de glicose e etanol, enquanto as células foram lavadas com água destilada e centrifugadas por três vezes para remover sólidos dissolvidos que podiam estar misturados com a biomassa.

Após as lavagens da células, a biomassa obtida foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, completou-se o volume com água destilada e realizou-se a leitura da absorbância, onde cada leitura foi convertida em massa celular por volume do meio pelo uso de uma curva padrão que relacionou a concentração celular com a absorbância a 610 nm.

3.9.2. Determinação dos parâmetros fermentativos

3.9.2.1. Fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$)

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (5)$$

Em que:

$Y_{P/S}$ corresponde ao fator de conversão de glicose em etanol ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$);

P e P_0 são as concentrações final e inicial de etanol, ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

S e S_0 são as concentrações final e inicial de glicose, ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

3.9.2.2 Produtividade em etanol (PE)

$$PE = \frac{P - P_0}{t_f} \quad (6)$$

Em que:

PE é a produtividade em etanol (g etanol formado $\cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$);
P e P_0 são as concentrações final e inicial de etanol, (g $\cdot L^{-1}$);
 t_f é o tempo de fermentação (h).

3.9.2.3. Eficiência de conversão (E)

$$E = \frac{Y_{P/S \text{ obtido}}}{Y_{P/S \text{ teórico}}} \cdot 100 \quad (7)$$

Em que:

E é a eficiência de conversão em etanol (%);

$Y_{P/S \text{ obtido}}$ é o fator de conversão dos açúcares (g etanol / g ART);

$Y_{P/S \text{ teórico}}$ é o fator de conversão teórico dos açúcares igual a 0,511 g etanol / g ART.

Capítulo 4

*Resultados e
Discussão*

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados da caracterização do cladódio seco da palma forrageira, da hidrólise ácida, hidrólise enzimática e a fermentação alcoólica do licor obtido nas condições otimizadas da hidrólise.

Uma observação pertinente a se fazer neste capítulo é que, na caracterização do cladódio da palma forrageira verificaram-se dificuldades de realização, sendo esta mencionada por outros pesquisadores que utilizaram este material. Desta forma, não foi possível comparações entre trabalhos com esta matéria-prima, sendo as mesmas realizadas com outros materiais lignocelulósicos estudados para a produção de etanol.

4.1. Caracterização da palma forrageira

Na Tabela 13 se encontram os dados físico-químicos dos cladódios da palma forrageira referentes à umidade, cinzas, extrativos, α -celulose, holocelulose, hemicelulose e lignina.

Tabela 13: Caracterização físico-química da palma forrageira

Componentes	Unidade	Resultados
Umidade b.u	%	11,14 \pm 0,66
Cinzas	%	17,73 \pm 0,72
Extrativos	%	16,90 \pm 1,10
Alfa-celulose	%	37,34 \pm 3,96
Holocelulose	%	48,22 \pm 0,76
Hemicelulose	%	10,88 \pm 2,96
Lignina	%	3,36 \pm 0,32

A partir dos resultados da caracterização da palma apresentados na Tabela 13 verificou-se um baixo teor de lignina e hemicelulose neste material comparado com outros materiais lignocelulósicos potenciais para produção de bioetanol. Para a palma forrageira em estudo o teor de lignina foi de 3,36%, enquanto Pitarelo (2007) encontrou teores de lignina em torno de 31 e 40% para o bagaço e palha da cana-de-açúcar, respectivamente, como também Rueda (2010) e Rocha (2010) encontraram teores de 25,1% no bagaço de cana e 33,62% no pedúnculo de caju, valores entre 7 e 12 vezes maiores que o teor encontrado para palma forrageira.

Quanto aos teores de hemicelulose, a palma forrageira apresentou em sua composição um valor de 10,88%. Em seus trabalhos, Rocha (2010), Oliveira (2012) e

Rabelo (2010) encontraram valores de 16,33% no pedúnculo de caju, 18,91% e 24,5%, ambos para o bagaço de cana, respectivamente, valores um pouco mais elevados que a hemicelulose encontrada para palma forrageira.

Com relação aos teores de α -celulose, o valor encontrado para palma forrageira foi de 37,34%. As matérias-primas estudadas por Rocha (2010), Oliveira (2012) e Rabelo (2010) apresentaram teores de 20,91% para o pedúnculo de caju, 38,09% e 40,50% no bagaço de cana, todos sem pré-tratamento, respectivamente, sendo, portanto, valores menores ou próximos do teor apresentado pela palma forrageira.

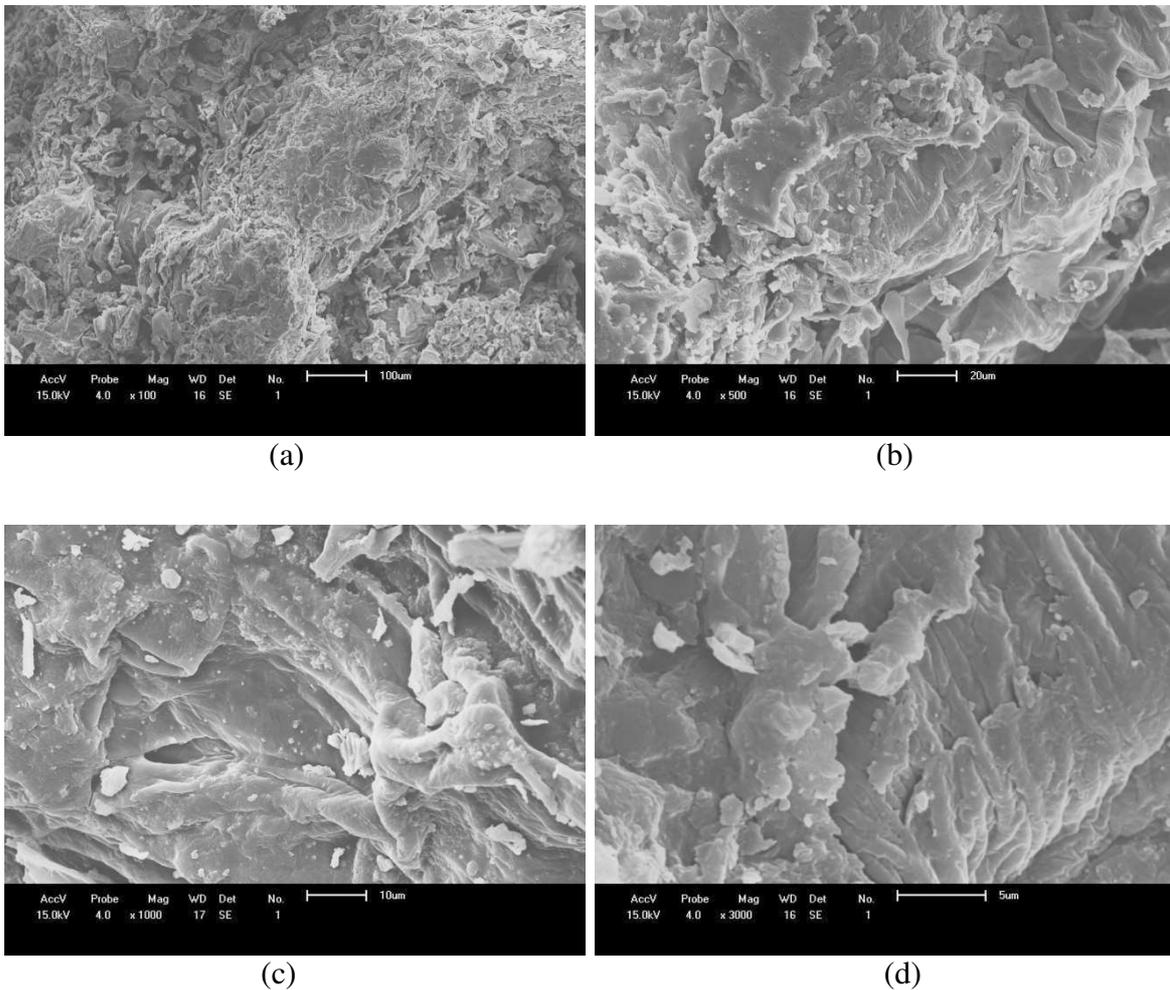
Verificou-se até o momento que a palma forrageira apresenta teor de α -celulose próximo aos encontrados em materiais estudados por outros pesquisadores que visam a produção de etanol e teores menores para a lignina e hemicelulose, estes que quanto mais elevados para estas matérias-primas, mais dificuldades são encontradas na reação de hidrólise, pois os mesmos dificultam a ação dos agentes hidrolíticos (ácido ou enzimas).

Com base nos valores de lignina e hemicelulose da palma forrageira em 3,36 e 10,88%, respectivamente, pode-se verificar que esta matéria-prima não necessita de pré-tratamentos para remoção/diminuição da hemicelulose e lignina para facilitar a ação dos agentes hidrolíticos, pois se observou que em outros materiais as reduções nestes teores apresentaram residuais, em média, maiores do que os existentes na palma *in natura*, como por exemplo, Rabelo (2010) que após pré-tratar o bagaço de cana-de-açúcar com Ca(OH)_2 obteve teores de lignina e hemicelulose de 8,1 e 12,4%, respectivamente.

4.2. Análise morfológica da palma forrageira por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com o objetivo de se verificar a forma como os materiais que compõem a parede vegetal da palma forrageira estavam dispostos, realizou-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV) deste material *in natura*, onde esta se apresenta na Figura 16 aumentada em 100, 500, 1000 e 3000x.

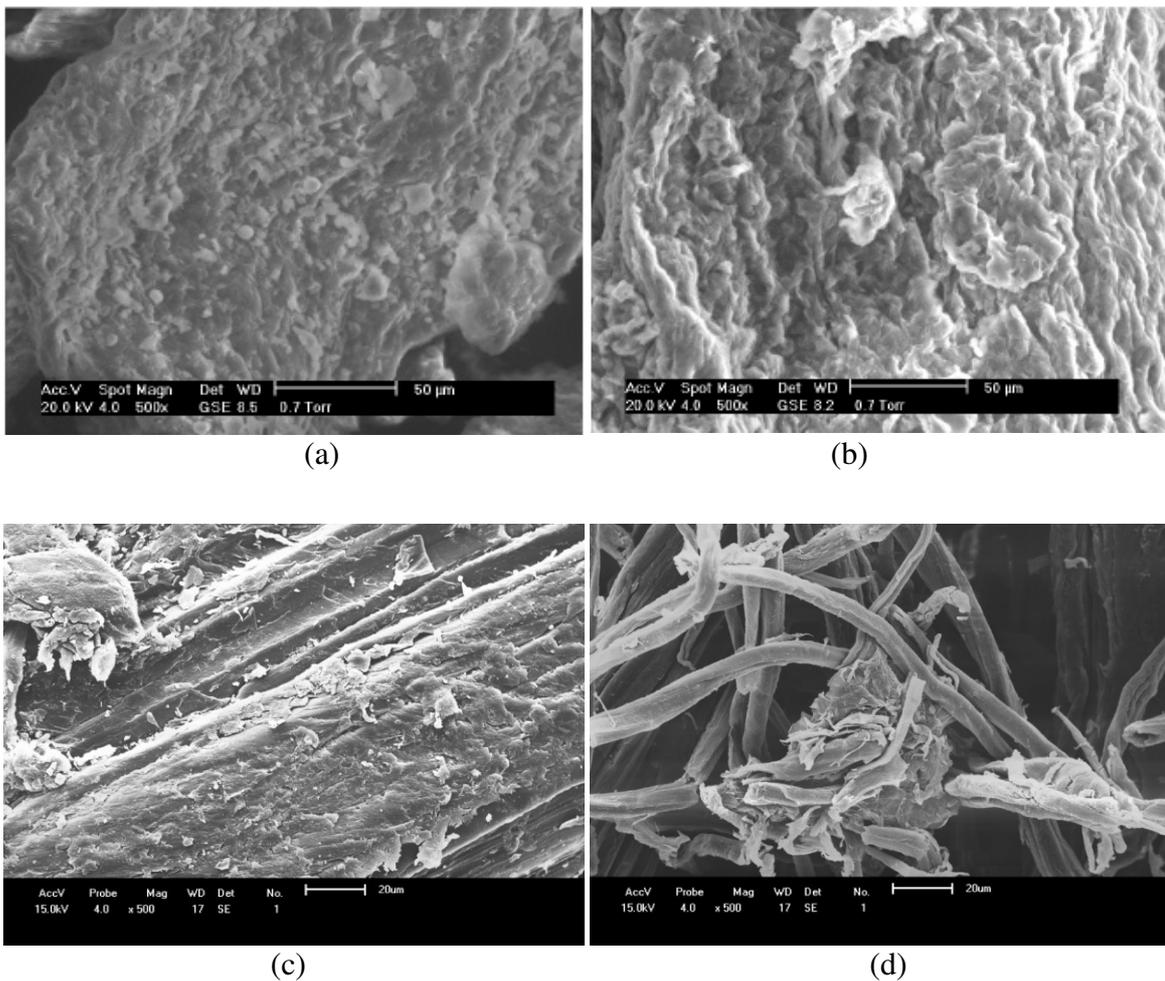
Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura do cladódio da palma *in natura* (a)100x, (b)500x, (c)1000x e (d)3000x



Através das microscopias apresentadas na Figura 16 pode-se observar uma desordem na estrutura da palma, evidenciando-se os resultados obtidos na caracterização que demonstraram um baixo teor de lignina e hemicelulose do material.

A Figura 17 apresenta as microscopias encontradas para o pedúnculo de caju e para a fibra do sisal analisadas por Rocha (2010) e Leão (2014), respectivamente, que estudaram a produção de etanol a partir destes materiais e realizaram pré-tratamentos.

Figura 17: Microscopias eletrônica de varredura 500x (a) pedúnculo de caju *in natura*; (b) pedúnculo de caju pré-tratado; (c) fibra de sisal *in natura*; (d) fibra de sisal pré-tratada



Comparando-se as microscopias *in natura* da palma, pedúnculo de caju e fibra de sisal em 500x pode-se observar que a palma apresenta uma estrutura bem mais aberta do que estes dois materiais e, que mesmo com o pré-tratamento, a forma estrutural do pedúnculo de caju se assemelha à da palma, verificando-se novamente a não necessidade de se realizar o pré-tratamento deste material.

4.3. Hidrólise ácida

A hidrólise ácida da palma forrageira foi realizada sem um pré-tratamento, pois como verificado na caracterização, os teores de lignina e hemicelulose são baixos para este material quando comparado a outros materiais citados, fazendo com que haja uma maior exposição da celulose aos agentes hidrolíticos, podendo esta ser hidrolisada diretamente a açúcares simples.

Na Tabela 14 estão apresentados os resultados das concentrações de glicose obtidos na hidrólise ácida para cada experimento realizado do planejamento experimental com ênfase para o Experimento 3, onde na temperatura de 140 °C, concentração de ácido de 3% e relação massa seca de palma/ácido 1:9 obteve-se a maior concentração de glicose, 7914,95 mg/L.

Tabela 14: Concentração de glicose obtida no planejamento experimental 2³

Experimento	Temperatura (T)	Concentração de ácido (C)	Relação massa seca de palma/ácido (R)	Glicose (mg·L ⁻¹)
1	- 1	- 1	-1	4718,51
2	+ 1	- 1	-1	4939,10
3	- 1	+ 1	-1	7914,95
4	+ 1	+ 1	-1	6612,84
5	- 1	- 1	+1	4692,69
6	+ 1	- 1	+1	4891,22
7	- 1	+ 1	+1	4683,33
8	+ 1	+ 1	+1	3771,82
9	0	0	0	5772,24
10	0	0	0	5748,50
11	0	0	0	5119,68

Os dados do planejamento realizado para hidrólise ácida foram analisados utilizando-se de uma regressão linear, obtendo-se modelo estatístico da relação resposta e variáveis de entrada, conforme Equação 8.

A Equação 8 apresenta o modelo codificado da resposta concentração de glicose, onde os coeficientes em negrito são os estatisticamente significativos.

$$\text{Glicose (mg/L)} = \mathbf{5351,35} - 448,63 \cdot T + \mathbf{935,36} \cdot C - \mathbf{1536,59} \cdot R - 658,19 \cdot T \cdot C + 92,14 \cdot T \cdot R - \mathbf{1499,74} \cdot C \cdot R \quad (8)$$

Em que:

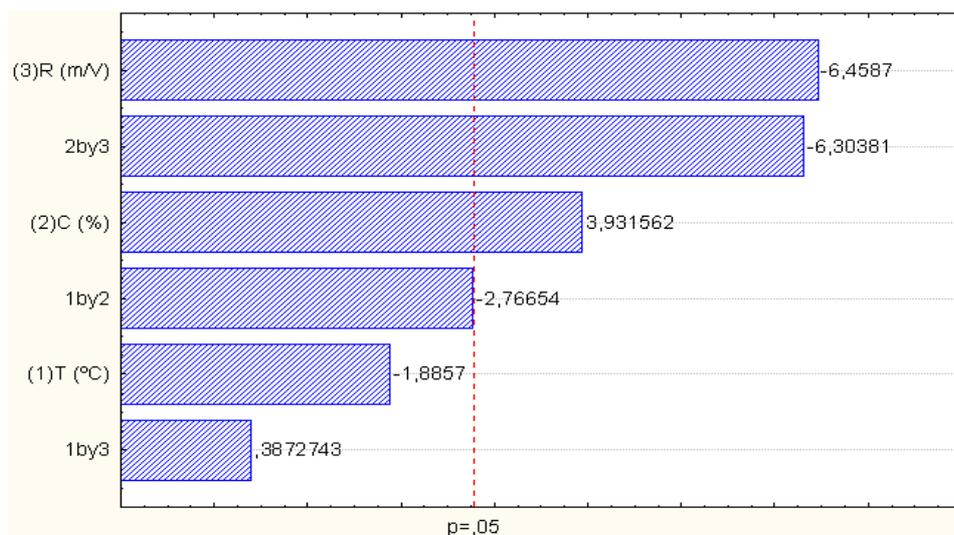
T é a variável temperatura (°C);

C é a variável concentração de ácido (% v/v);

R é a relação massa seca de palma/ácido (m/v).

O diagrama de Pareto apresenta as variáveis com ou não significância estatística com 95% de confiança conforme mostrado na Figura 18.

Figura 18: Diagrama de Pareto para a hidrólise ácida



Em que:

- (1) é a variável temperatura (°C);
- (2) é a variável concentração de ácido (% v/v);
- (3) é a variável relação massa seca de palma/ácido (m/v).

A partir dos resultados das variáveis controladas sobre a variável resposta apresentados na forma do diagrama de Pareto, Figura 18, observa-se que foram estatisticamente significativos, ao nível de 95% de confiança, os coeficientes das variáveis independentes concentração de ácido, relação massa seca de palma/ácido e a interação destas duas variáveis.

Para análise da significância do modelo de regressão dos dados experimentais do planejamento fatorial proposto, construiu-se a ANOVA e os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: ANOVA para a resposta concentração de glicose

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	10970396	3	3656798,67	14,72
Resíduo	1738735	7	248390,71	
Falta de ajuste	1464797	5		
Erro puro	273938	2		
Total	12709131	10		

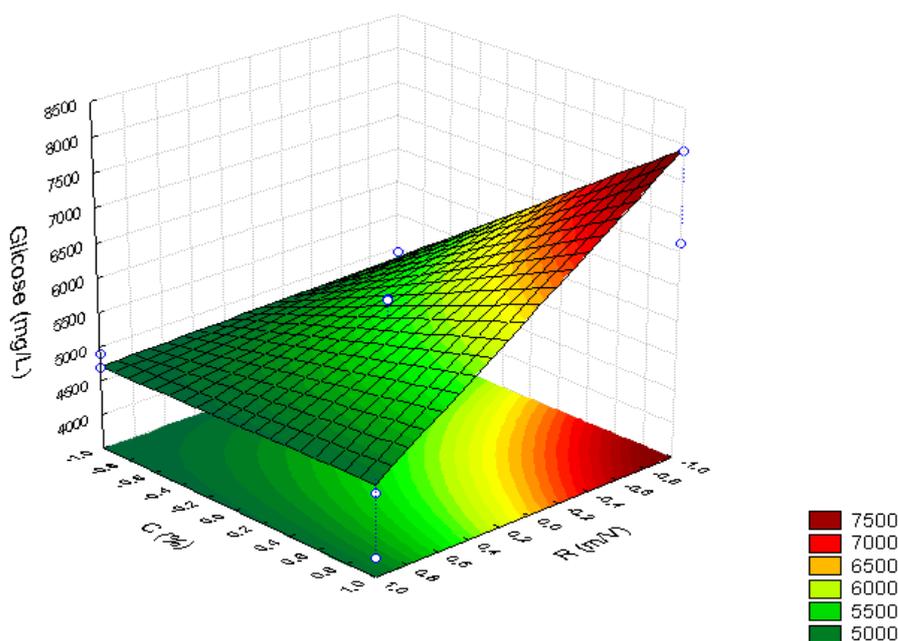
$$R^2=96,44\%$$

$$F_{\text{tabelado}} 0,95;3;7 = 4,35$$

Com os dados presentes na Tabela 15, verifica-se que a razão entre o $F_{\text{calculado}}$ e o F_{tabelado} foi de 3,4, estando este acima de 1,0. Segundo Rodrigues e Iemma (2009) quando esta proporção ocorre, pode-se dizer que o modelo proposto para a variável dependente é estatisticamente significativo, ao nível de 95% de confiança.

Sendo o modelo da resposta em estudo estatisticamente significativo, pode-se construir a superfície de resposta, observando-se a Figura 19 que apresenta a influência da concentração de ácido e da relação massa seca de palma/ácido sobre a concentração de glicose no licor hidrolisado, fixando a temperatura no nível -1 (140 °C).

Figura 19: Superfície de resposta para o planejamento da hidrólise ácida
(C) – concentração do ácido; (R) – relação massa seca de palma/ácido



Analisando-se a Figura 19, observa-se que o aumento da concentração de ácido e a diminuição da relação massa seca de palma/ácido propicia um aumento na concentração de glicose, onde se operando nos níveis +1 e -1 para estas variáveis, respectivamente, obtêm-se concentrações de glicose no licor hidrolisado acima de $7500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.4. Hidrólise enzimática

A Tabela 16 apresenta os resultados da cinética para os rendimentos do processo realizado no planejamento fatorial 2^2 .

Tabela 16: Resultados da cinética para o planejamento experimental da hidrólise enzimática

Tempo (h)	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7
6	17,11	27,50	19,40	26,52	20,21	20,09	20,32
12	17,15	29,42	27,23	29,42	25,40	25,77	20,67
24	43,99	63,71	25,11	29,44	37,92	35,46	43,17
36	41,99	42,55	31,68	38,84	31,85	39,22	40,77
48	31,72	47,46	46,23	47,08	44,66	50,40	38,86
60	25,09	87,57	62,89	48,15	30,33	50,19	31,87

A Figura 20 mostra o perfil da cinética dos rendimentos obtidos nos experimentos 1 a 4, enquanto a Figura 21 mostra o perfil da cinética dos rendimentos obtidos nos pontos centrais do planejamento experimental fatorial 2^2 para uma melhor visualização dos resultados expostos na Tabela 16.

Figura 20: Cinética da hidrólise enzimática para os experimentos 1, 2, 3 e 4 do planejamento experimental

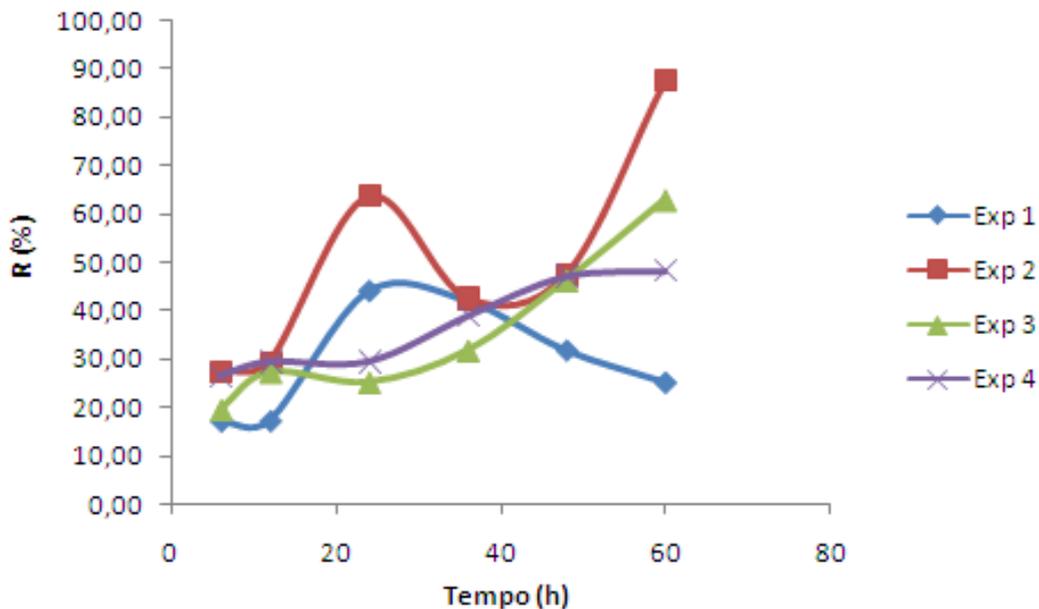
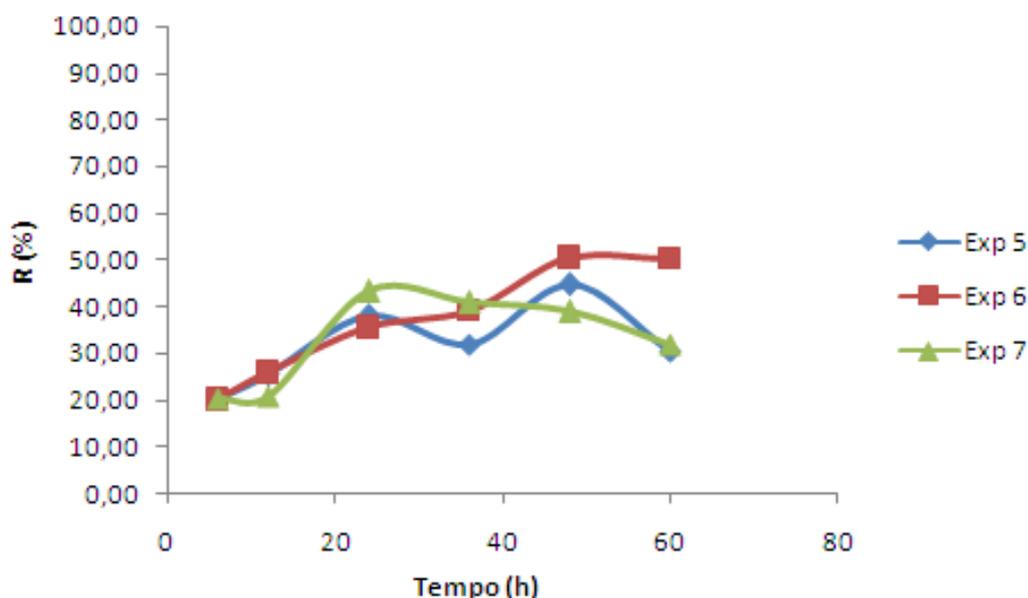


Figura 21: Cinética da hidrólise enzimática para os experimentos 5, 6, e 7 do planejamento experimental (pontos centrais)



Observando-se as Figuras 20 e 21, verifica-se rendimento máximo de conversão de celulose em glicose de 87,57% para um tempo de hidrólise de 60 horas nas condições experimentais de carga enzimática em 25 FPU/g e relação massa seca de palma/extrato de 2%. No entanto, após análise dos resultados, observou-se que a cinética para o tempo de hidrólise em 60 horas não foi estatisticamente significativa, mas que para o tempo de 24 horas houve significância conforme valores de p (probabilidade de significância) e R^2 (coeficiente de determinação) apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Valores da probabilidade de significância (p) e do coeficiente de determinação (R^2)

Variável	Tempo = 24 h		Tempo = 36 h		Tempo 48 h		Tempo = 60 h	
	p	R^2 (%)	P	R^2 (%)	p	R^2 (%)	p	R^2 (%)
A	0,040		0,411		0,186		0,246	
B	0,005	96,19	0,182	60,38	0,241	71,16	0,964	71,33
Interação	0,113		0,475		0,222		0,103	

Em que:

(A) é a variável carga enzimática (FPU/g);

(B) é a variável relação massa seca de palma/extrato (% m/v).

A partir dos valores de p da Tabela 17 para cada variável envolvida no planejamento fatorial 2^2 pode-se verificar que, apenas para o tempo de 24 horas, estes

foram menores que o nível de significância pré-determinado de 0,05, sendo, portanto, o tempo que apresentou significância e que será analisado a seguir.

Desta forma, estão apresentados na Tabela 18 os rendimentos obtidos para cada experimento do planejamento experimental fatorial em um tempo de hidrólise de 24 horas.

Tabela 18: Rendimentos obtidos no planejamento experimental 2^2 para o tempo de 24 horas

Experimento	Carga enzimática	Relação massa seca de palma/extrato enzimático	Rendimento (%)
1	- 1	-1	43,99
2	+ 1	-1	63,71
3	- 1	+1	25,11
4	+ 1	+1	29,44
5	0	0	37,92
6	0	0	35,46
7	0	0	43,17

Os dados de rendimentos do planejamento realizado para hidrólise enzimática também foram analisados utilizando-se de uma regressão linear, obtendo-se modelo estatístico da relação resposta e variáveis de entrada, conforme Equação 9.

A Equação 9 apresenta o modelo codificado da resposta rendimento de conversão de celulose em glicose, onde os coeficientes em negrito são os estatisticamente significativos.

$$\text{Rendimento (\%)} = \mathbf{39,8286} + \mathbf{12,0250 \cdot A} - \mathbf{26,5750 \cdot B} - 7,6950 \cdot A \cdot B \quad (9)$$

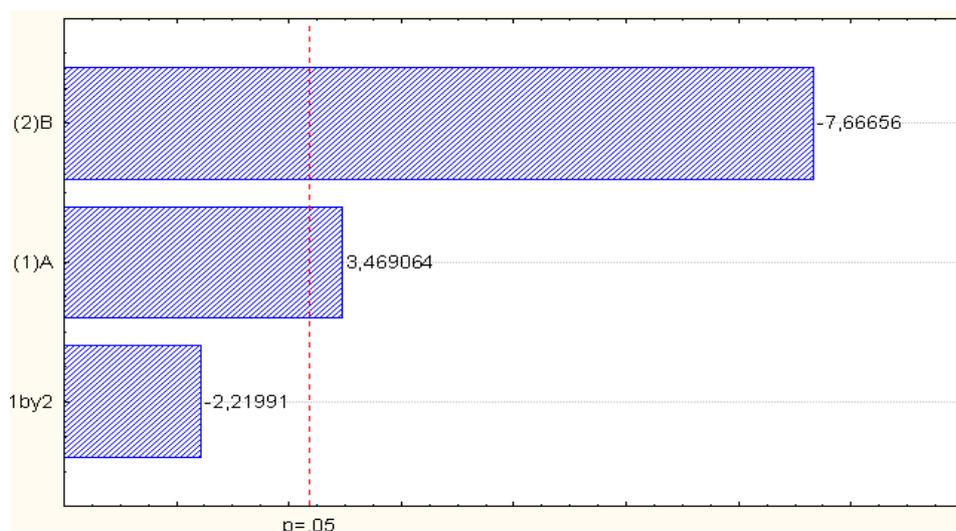
Em que:

(A) é a variável carga enzimática (FPU/g);

(B) é a variável relação massa seca de palma/extrato (% m/v).

O diagrama de Pareto apresenta as variáveis com ou não significância estatística com 95% de confiança conforme mostrado na Figura 22.

Figura 22: Diagrama de Pareto para o planejamento da hidrólise enzimática para o tempo de 24 horas



Em que:

(A) é a variável carga enzimática (FPU/g);

(B) é a variável relação massa seca de palma/extrato (% m/v).

Com os resultados das variáveis controladas sobre a variável resposta apresentados na forma do diagrama de Pareto, Figura 22, observa-se que foram estatisticamente significativos, ao nível de 95% de confiança, os coeficientes das variáveis independentes carga enzimática e a relação massa seca de palma/extrato.

Para análise da significância do modelo de regressão dos dados experimentais do planejamento fatorial proposto, construiu-se a ANOVA e os resultados estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: ANOVA para a resposta rendimento da hidrólise enzimática no tempo de 24 horas

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	850,8313	2	425,416	17,86
Resíduo	95,2598	4	23,815	
Falta de ajuste	64,2404	2		
Erro puro	31,0194	2		
Total	946,0911	6		

$$R^2 = 96,19\%$$

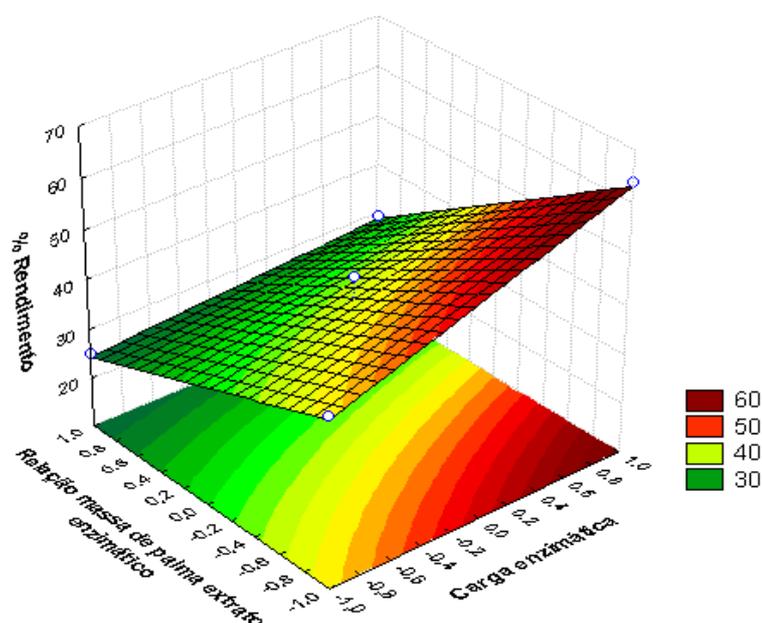
$$F_{\text{tabelado}} 0,95;2;4 = 6,94$$

A partir dos dados presentes na Tabela 19, verifica-se que a razão entre o $F_{\text{calculado}}$ e o F_{tabelado} foi de 2,6, estando este acima de 1,0. Segundo Rodrigues e Iemma (2009) quando

esta proporção ocorre, pode-se dizer que o modelo proposto para a variável dependente é estatisticamente significativo, ao nível de 95% de confiança.

Sendo o modelo da resposta em estudo estatisticamente significativo, pode-se construir a superfície de resposta, observando-se a Figura 23 que apresenta a influência da carga enzimática e da relação massa seca de palma/extrato sobre o rendimento de conversão da celulose em glicose.

Figura 23: Superfície de resposta para o planejamento da hidrólise enzimática no tempo de 24 horas



Analisando-se a Figura 23, observa-se que o aumento da carga enzimática e a diminuição da relação massa seca de palma/extrato propicia um aumento no rendimento da conversão da celulose em glicose, onde se operando nos níveis +1 e -1 para estas variáveis, respectivamente, obtém-se rendimentos acima de 60%.

Aplicando-se os níveis das variáveis significativas +1 e -1 para a carga enzimática e a relação massa seca de palma/extrato, respectivamente, no modelo codificado para resposta rendimento de hidrólise (Equação 9) pode-se obter valor máximo de até 78,43% para esta variável, valores comparáveis aos de Fuentes (2009), Rueda (2010) e Pitarelo (2007) que encontraram rendimentos da hidrólise de 78,55, 91,73 e 65,50% para as hidrólises enzimáticas dos bagaços de cana-de-açúcar, respectivamente.

Vale salientar que os rendimentos citados anteriormente foram obtidos para palma forrageira *in natura*, isto é, sem pré-tratamento, enquanto Fuentes (2009), Rueda (2010) e

Pitarelo (2007) realizaram pré-tratamentos em seus bagaços de cana-de-açúcar para conseguirem atingir este patamar.

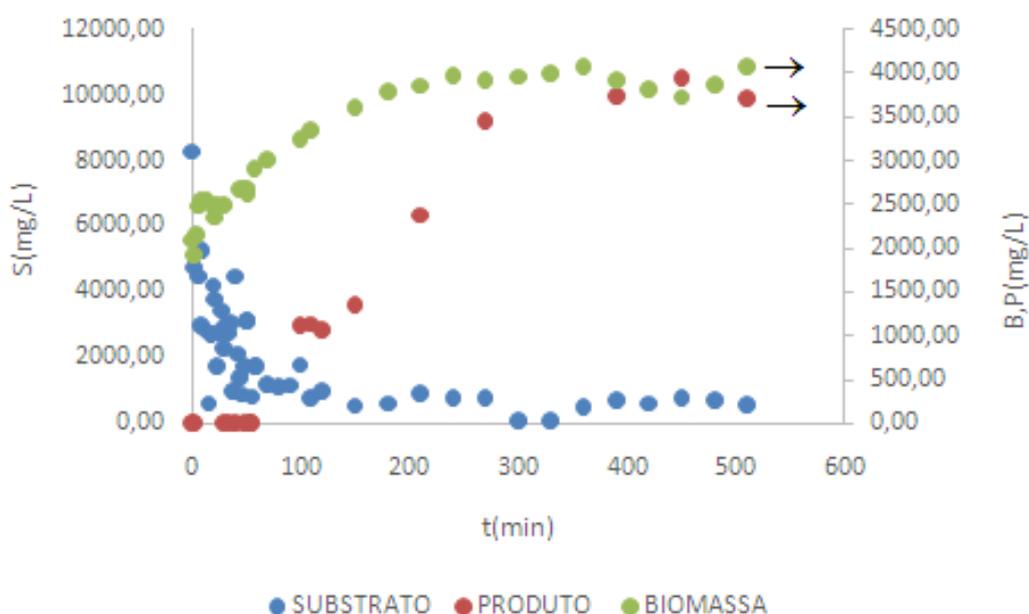
4.5. Fermentação alcoólica

Para a fermentação alcoólica do licor hidrolisado foi considerado apenas o obtido na hidrólise enzimática, pois devido a cálculos de eficiência, verificou-se a não viabilidade de fermentação dos açúcares obtidos na hidrólise ácida em virtude da quantidade de palma seca ser 3,33 vezes maior nesta hidrólise do que na enzimática para se conseguir a mesma concentração de açúcares fermentáveis.

A fermentação do produto obtido na hidrólise enzimática foi realizada com o licor produzido em maiores quantidades para a melhor condição encontrada no planejamento experimental, isto é, carga enzimática no nível +1 (25 FPU/g) e relação massa seca de palma/extrato no nível -1 (2%).

Após obtenção do licor hidrolisado quantificou-se os açúcares diretamente fermentáveis, obtendo-se um valor inicial de $8266,15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que foi a soma da glicose obtida na hidrólise com os açúcares (glicose + frutose) existentes inicialmente na palma, visto que a mesma não passou por nenhum pré-tratamento e nem lavagem para remoção destes açúcares.

Figura 24: Perfis da cinética da fermentação alcoólica do licor hidrolisado enzimaticamente



Na Figura 24 estão apresentados os perfis da cinética para a fermentação alcoólica, observando-se a concentração de substrato (glicose + frutose), concentração do produto (etanol) e a concentração de biomassa.

A partir dos perfis de substrato, produto e biomassa na Figura 24 pode-se verificar, já no início da fermentação, o aumento da concentração de biomassa, não sendo perceptível a fase lag ou de latência do crescimento microbiano. Segundo Schmidell (2001) esta fase pode não existir se as células forem pré-cultivadas em um meio de composição semelhante ao meio em que elas serão utilizadas, como é o caso da cepa Y-904 utilizada nesta fermentação.

Com relação ao consumo de açúcares e produção de etanol, observa-se na Figura 24 que em um tempo de fermentação de aproximadamente 400 minutos (seis horas e meia) já poderia se considerar terminada a fermentação alcoólica visto uma constância nos valores das concentrações destas substâncias, resultando em uma concentração residual de açúcares de $670,39 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e concentração final de etanol de $3804,90 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, correspondendo a aproximadamente $0,5 \text{ }^\circ\text{GL}$.

Com os resultados das concentrações inicial e final das substâncias envolvidas na fermentação calcularam-se os parâmetros fermentativos com o auxílio das Equações 5, 6 e 7, sendo estes apresentados na Tabela 20.

Tabela 20: Parâmetros fermentativos da fermentação do licor hidrolisado enzimaticamente

Parâmetro	Resultado
$Y_{P/S}$	0,501
PE (g/L.h)	0,571
E (%)	98

Os parâmetros fermentativos obtidos para a fermentação alcoólica do licor hidrolisado enzimaticamente da palma forrageira foram ótimos, visto que se atingiu, principalmente, um rendimento experimental de conversão de substrato em produto $Y_{P/S}$ de 0,501, o que correspondeu a 98% de conversão dos açúcares contidos no licor a etanol.

Segundo a Alcoolbrás (2006), os valores médios obtidos para os rendimentos industriais na fermentação alcoólica do caldo de cana-de-açúcar avançaram nas últimas décadas variando-se em torno de 90 a 92%, valores menores que os obtidos por este trabalho.

Comparando o valor do rendimento de conversão de açúcar em etanol com os valores obtidos por Rocha (2010) e Mendonça et al. (2009) que estudaram a produção de etanol a partir do pedúnculo de caju, produção de etanol a partir de meios com altos valores de concentração inicial de sacarose, e obtiveram valores máximos de 0,49, o rendimento obtido para a palma foi de 0,501, sendo maior que os obtidos pelos respectivos autores.

Quanto à produtividade da fermentação, o valor obtido para a palma forrageira foi de 0,571 g/L·h, valor bem inferior aos obtidos por Rocha (2010) e Mendonça et al. (2009), que encontraram produtividades de 9,71 e 7,66 g/L·h, respectivamente. Este valor baixo se deve provavelmente à baixa concentração do substrato, que segundo Schmidell (2001), concentrações baixas favorecem diminuição da velocidade de fermentação e da produtividade.

4.6. Considerações finais

Nos estudos realizados para palma forrageira neste trabalho, todos foram realizados operando-se com o material seco, em baixas concentrações de sólidos no meio reacional (2, 3 e 4% (m/v)) e sem realização de pré-tratamentos, visto os baixos teores de hemicelulose e lignina neste material. Levando-se em conta que esta matéria-prima apresenta, em média, 90% de umidade e apenas 10% de matéria seca, as seguintes observações devem ser levadas em consideração:

- Uma tonelada de palma forrageira seca com a composição encontrada neste trabalho de 37,34% em α -celulose pode produzir em torno de 266 litros de etanol;
- Levando-se em consideração o teor de umidade médio, este valor pode chegar até 27 litros, enquanto a partir do caldo de cana, obtém-se em média 90 litros de etanol por tonelada de cana;
- A concentração de sólidos baixa impacta também em um licor hidrolisado com baixo teor de açúcar fermentável, o que ocasiona diminuição na velocidade de fermentação e produtividade, bem como aumento no consumo de vapor nos aparelhos de destilação, dificultando a separação etanol/água no vinho produzido;

Baseado nestas considerações, as seguintes ações podem ser tomadas para minimizar estes impactos:

- Utilizar a própria umidade da palma para composição do extrato enzimático;

- Diluir o caldo de cana nas destilarias (quando a concentração estiver acima de 22 °Brix) com o licor hidrolisado obtido neste processo, visto que industrialmente se faz necessária essa diluição para baixar a concentração de açúcares e evitar problemas na fermentação como, por exemplo, estresse osmótico das leveduras;
- Nas destilarias que utilizam melaço como matéria-prima, utilizar o licor hidrolisado também para diluição do mesmo;
- Concentrar o licor hidrolisado através de um processo de evaporação;
- Aumentar a concentração de sólidos na reação de hidrólise, visando-se assim, um licor mais concentrado em açúcares fermentáveis.

Com base nos dados apresentados, a palma forrageira apresenta-se como uma matéria-prima potencial para sacarificação da celulose e fermentação alcoólica dos açúcares obtidos, visto que se obteve alta conversão da celulose em glicose e, posterior, elevada conversão desta em etanol.

Capítulo 5

Conclusões

5. CONCLUSÕES

A caracterização físico-química da palma forrageira mostrou que o teor de celulose obtido possibilita a sua utilização como matéria-prima disponível para sacarificação e fermentação visando a produção de etanol combustível.

Os teores de hemicelulose e lignina para a palma foram baixos, quando comparado à outros materiais lignocelulósicos, sendo estes evidenciados pela caracterização morfológica ao se usar a MEV, verificando-se a não necessidade de um pré-tratamento deste material para se obter bom rendimento em glicose.

Operando-se na concentração mais elevada de ácido (3%) e na menor relação massa seca de palma/ácido (1:9) e, para hidrólise enzimática, operando-se na maior carga enzimática (25) e na menor relação massa seca de palma/extrato obtiveram-se os melhores resultados da concentração de glicose (acima de 7500 mg/L) e rendimento de conversão de celulose em glicose (acima de 60%), respectivamente.

Os açúcares obtidos a partir da palma forrageira apresentaram boa fermentabilidade, ocasionando em um rendimento de 98%, valores superiores aos obtidos industrialmente.

O licor hidrolisado obtido e até mesmo a umidade da palma, apesar da baixa concentração de açúcares, pode ser utilizado diretamente para fermentação alcoólica ou em diluições do caldo e melaço nas indústrias de cana de açúcar, diminuindo assim, a quantidade de água utilizada na indústria para esse fim.

Com base nos resultados apresentados, a palma é uma matéria-prima lignocelulósica com alto potencial para a conversão da celulose em açúcares diretamente fermentáveis, ampliando a oferta de materiais disponíveis para a produção de etanol combustível e criando-se mais uma alternativa para a sua utilização.

Capítulo 6

*Referências
Bibliográficas*

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADENE (Agência para a Energia) e AREAC (Agência Regional de Energia e Ambiente do Centro). Energias renováveis em meio urbano. Boletim Técnico, março de 2005.

ALBURQUERQUE, S. G. Pesquisador Embrapa Semi-Árido. EMBRAPA (A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 05 de agosto de 2004 site: http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2004/agosto/bn.2004-11-2738405709/mostra_noticia. Acessado em 14 de novembro de 2006.

ALCOOBRÁS. Revista Alcoolbrás. Edição nº 101. Abril, 2006.

ALMEIDA NETO, J. X.; MEDEIROS, F. P. M.; MELO, A. J. M.; SILVA, J. C., DANTAS, J. P. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) In Vivo. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 5, n. 2, 2005.

ARANTES, V. e SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. Biotechnology for Biofuels, v. 3, n. 4, 2010.

BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p.5-38, março, 2007.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. Progress in Energy and Combustion Science, v. 34, n. 25, p. 551-553, 2008.

CAMPBELL, M. K. Bioquímica. Porto Alegre: 3 ed., Artmed Editora, p. 751, 2000.

CARVALHO, G. B. M.; GINORIS, Y. P.; CANDIDO, E. J.; CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Estudo do hidrolisado de eucalipto em diferentes concentrações utilizando evaporação a vácuo para fins fermentativos. Revista Analytica, v.1, n.14, p.54-57, 2005.

DATAMÉTRICA. Projeto Palma Relatório Técnico. Relatório, maio de 2004.

DENCE, C. W.; LIN, S. Y. Methods in lignin chemistry. New York. Springer Verlag, 1992.

FASANELLA, C. C. Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo, 2008.

FENGEL, D.; WEGENER G. WOOD: Chemistry, ultrastructure, reactions. Berlim, p. 613, 1989. Disponível em: <<http://catalogur.Nla.Gov.au/Record/876242>>. Acesso em 14 jun. 2012.

FERREIRA, M. A. Utilização de Palma Forrageira na Alimentação de Ruminantes. In: Simposio Nordeste de Alimentação de Ruminantes. Campina Grande, 2005.

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

FUENTES, L. L. G. Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Unicamp, 2009.

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

HICKERT, L. R. Otimização da hidrólise da casca de arroz (*Oryza sativa*) e avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras. Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

HUBER, G. W.; IBORRA, S.; CORMA, A. Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts and Engineering. Chem. Rev. v. 106, n. 9, p. 4044-4098, 2006.

KLOCK, U.; MUJNIZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S. Química da madeira, 2005.

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, p. 467-470, 2000.

LARA, F.M. Princípios de resistência de plantas a insetos. 2.ed. São Paulo: Ícone, 336p. 1991.

LEÃO, D. A. S. Potencialidade de obtenção de etanol a partir da fibra do sisal. Tese de doutorado em Engenharia de Processos. Universidade Federal de Campina Grande, 2014.

LEITE, M. L. M. V. Palma forrageira (*Opuntia ficus indica* e *Nopalea cochenilifera*). Universidade Federal da Paraíba – UFPB / Centro de Ciências Agrárias – CCA. Grupo de Pesquisa Lavoura Xerófila – GPLX. Areia – PB, 2006.

LIMA, L. R; MARCONDES, A. A. Álcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira. Curitiba: Editora UFPR, 248p. 2002.

LIMA, A. O. S.; RODRIGUES, A. L. Sacarificação de resíduos celulósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa. Revista de ciências ambientais, v. 1, n. 2, p. 5-18, 2007.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos. 1ª ed. v. 3. São Paulo. Edgard Blucher Ltda, 2001.

LYND, L.; WEIMER, P.; ZYL, W.; PRETORIUS, A. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbio. Molec. Bio. Reviews*, p. 506-577, 2002.

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2010). Secretaria de Produção e Agroenergia. Departamento da cana-de-açúcar e Agroenergia. Produção brasileira de etanol. Disponível em www.agricultura.gov.br. Acesso em fevereiro de 2010.

MENDONÇA, J. C. M.; ANDRADE, L. A.; RIBEIRO, E. J.; CARDOSO, V. L. Contribuição ao estudo da fermentação alcoólica em altas concentrações iniciais de sacarose. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Uberlândia. Minas Gerais, 2009.

MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B. Fisiologia da Palma. Editora Universitária UFPE, 2005.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. Fórum de Competitividade de Biotecnologia. Estratégia Nacional de Biotecnologia. Política de desenvolvimento da bioindústria. Brasília, julho, 2006.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M.; Documentos 236 – Procedimentos para Análise Lignocelulósica. Embrapa Algodão – Campina Grande/PB. Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP). ISSN 0103-0205, 1ª ed., v. 1, pg. 10-58; 2010.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Chemical analysis of Pinus oocarpa wood Parte I, Quantification of macromolecular components and volatile extractives. *Revista Árvore*, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F.S. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova*, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, C. C. S. Otimização do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino a alta concentração de sólidos para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Unicamp, 2012.

PARRY, M. Climatic change and world agriculture. Earthscan Publications, London, 1990.

PEREIRA JR., N. Biotecnologia de materiais lignocelulósicos para a produção química. EQ/UFRJ, Prêmio Abiquim de Tecnologia, 2006.

PEREIRA JR., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In *Series on Biotechnology*, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 45 p. 2008.

PITARELO, A. P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. Dissertação de mestrado em química. Universidade Federal do Paraná, 2007.

RABELO S. C. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Campinas: Dissertação de Mestrado da Faculdade de Engenharia Química, 2007.

RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia Química. Unicamp, 2010.

RAHMAN, S. H. A. Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose. *Bioresour Technol.*, v. 98, p. 554-559, 2007.

RAMOS, L. P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro-industriais. Seminário Nacional sobre Reuso/Reciclagem de Resíduos Sólidos Industriais. São Paulo, 2000.

RAO, R. S. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. *Bioresour Technol.*, v. 97, p. 1974-1978, 2006.

ROBERTSON G. H. Native or raw starch digestion: a key step in energy efficient biorefining of grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 2, p. 353-365, 2006.

ROCHA, M. V. P. Produção de bioetanol a partir do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) por fermentação submersa. Tese de doutorado em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Casa do Pão Editora, 325p. 2009.

ROSSELL, C. E. Fermentação de hidrolisado. III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise para Produção de Etanol. São Paulo, 2006.

RUEDA, S. M. G. Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Unicamp, 2010.

SAHA, B. C. Hemicelulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 30, p. 279-291, 2003.

SANTOS, D.C.; FARIAS, I.; LIRA, M. A. Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco. Recife: Instituto Agrônomo de Pernambuco, 48p. 2006.

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, p. 1004-1010, 2012.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia industrial: Engenharia bioquímica. 1ª ed. v. 2. São Paulo. Edgard Blucher Ltda, 2001.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima. Química Nova. v. 24, n. 2, p. 247-251, 2001.

SEAGRI/AL, Grupo de Pesquisadores do Estado de Alagoas, 2012.

SEBRAE/PB, Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira, Estudo da FAO em produção e proteção vegetal, 2001.

SILVA, C. C. F.; SANTOS, L. C. Palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) como alternativa na alimentação de ruminantes (Forage palm (*Opuntia ficus-indica* Mill) as alternative in ruminant feeding). Revista Electrónica de Veterinaria, v. VIII, n. 5, 2007.

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

SILVA, N. L. C. Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose. Dissertação de Mestrado. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, V. L.; COSTA, L.S; BASTOS, M. P. V.; FACURI, L. M. A. M; JÚNIOR, N. O. R.; SILVA, M. V. Caracterização físico-química e bioquímica do farelo de palma forrageira redonda (*Opuntia ficus*) utilizado na alimentação de ruminantes. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia - PUBVET, Londrina, v. 5, n.2, Ed.149, Art. 1002, 2011.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. Semina: Ciências Agrárias, v. 25, p. 315-330, 2004.

TAMANINI, C.; OLIVEIRA, A. S.; FELIPE, M. G. A.; CANETTIERI, E. V.; CÂNDIDO, E. J.; HAULY, M. C. O. Avaliação da casca de aveia para produção biotecnológica de Xilitol. Acta Scientiarum. Technology, Maringá, v. 26, n.2, p.117-125, 2004.

TÍMAR-BALÁZSY, A.; EASTOP, D. Chemical principles of textile conversation. Oxford, UK. Butterworth-Heinemann, 1998.

TOSETTO, G. M. Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Dissertação (Mestrado), 147 p., 2002.

VASCONCELOS, A. G. V.; LIRA, M. A.; CAVALCANTI, V. L. B.; SANTOS, M.V.F.; WILLADINO, L. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius sp*). Revista Brasileira de Zootecnia, v. 38, n. 5, p.827-831, 2009.

VILLEN, R. A. Maúa: Biotecnologia – Histórico e Tendências. Escola de Engenharia de Maúa. Apostila, 2009.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. A functionally based model for hydrolusis of cellulose by fungal cellulose. Biotechnol. Bioeng., v. 94, p. 888, 2006.