

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis

Daniel de Azevedo Teixeira

PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE AGUAPÉ

(Eichhornia crassipes)

Teófilo Otoni – MG

2019

Daniel de Azevedo Teixeira

PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE AGUAPÉ
(*Eichhornia crassipes*)

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biocombustíveis *Stricto Sensu* da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri-UFVJM como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia em Biocombustíveis.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Sylvio Vieira da Costa

Coorientadores: Prof. Alexandre Soares dos Santos
Profa. Lílian de Araújo Pantoja

Diamantina – MG

2019

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

T266p

Teixeira, Daniel de Azevedo

Produção etanol de segunda geração a partir de aguapé (*Eichhornia crassipe*) / Daniel de Azevedo Teixeira, 2019.

84 p. : il.

Orientador: Alexandre Sylvio Vieira da Costa

Coorientadores: Alexandre Soares dos Santos, Lílian de Araújo Pantoja

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Biomassa lignocelulósica. 2. Bioetanol. 3. Aguapé. 3. Pré-tratamento. I. Costa, Alexandre Sylvio Vieira da. II. Santos, Alexandre Soares dos. III. Pantoja, Lílian de Araújo. IV. Título. V. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 662.669

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Nádia Santos Barbosa – CRB6/3468


DANIEL DE AZEVEDO TEIXEIRA

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE
AGUAPÉ (*Eichhornia crassipes*).**

Tese apresentada ao DOUTORADO
EM BIOCOMBUSTÍVEIS, nível de
DOUTORADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM BIOCOMBUSTÍVEIS

Orientador (a): Prof. Dr. Alexandre
Sylvio Vieira Da Costa

Data da aprovação: 07/08/2019



Prof.Dr. ALEXANDRE SYLVIO VIEIRA DA COSTA - UFVJM



Prof.Dr. NAIDILENE CHAVES AGUILAR - UNEC



Prof.Dr. IVAN CARLOS CARREIRO ALMEIDA - IFNMG



Prof.Dr. RAFAEL ALVARÉNGA ALMEIDA - UFVJM



Prof.Dr. JAIRO LISBOA RODRIGUES - UFVJM

**“Querido Deus, dai-me forças para permanecer em pé,
quando ninguém mais está.” (Daniel, 3:16-18).**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção e benção em todos os momentos e por estar sempre presente na minha vida.

À minha amada Leslie alicerce da minha vida, ao Pedro Henrique razão do meu viver. Pai, Mãe e Henrique que sempre estiveram comigo.

Ao meu estimado orientador Dr.Alexandre Sylvio Vieira da Costa e especialmente aos meus coorientadores Dr. Alexandre Soares dos Santos e Dra.Lílian de Araújo Pantoja por toda dedicação e esforços empenhados nessa jornada;

Aos amigos Vingadores, em especial ao Rodrigo Hott (Capitão América) e Ciro Santos, por todo companheirismo, cumplicidade e parceria nessa batalha.

Aos grandes amigos do Doutorado, Philipe Brito, Fidel Aguilar, Farley Menezes e Gabriela Barbosa pelo apoio de todas as horas.

RESUMO

A Aguapé é uma planta macrófita aquática considerada como biomassa lignocelulósica. A composição química do Aguapé apresenta-se em teores consideráveis de celulose e hemicelulose, e baixos teores de lignina, o que configura como potencial substrato para a produção de etanol. O presente estudo tem por objetivo desenvolver uma tecnologia para a produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa de Aguapé. No intuito de alcançar os objetivos propostos, foi realizada a caracterização química da biomassa de Aguapé, posteriormente etapas de pré-tratamento ácido e alcalino, otimização do pré-tratamento ácido, sacarificação, fermentação e destilação. Inicialmente foi determinada a composição centesimal da Aguapé, indicando a presença de 32,50% de celulose, 28,61% de hemicelulose e 7,46% de lignina. Dentre as diferentes formas de pré-tratamento analisadas, o pré-tratamento ácido apresentou melhor desempenho no processo de sacarificação apresentando cerca de 46,16% de rendimento na conversão de açúcares redutores. A otimização do pré-tratamento ácido foi aplicado um Planejamento Fatorial através de delineamento composto central rotacional. O programa STATISTICA Versão 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa) foi utilizado para análise dos dados. O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído resultou na remoção de pelo menos 81% da hemicelulose presente na Aguapé e 87% da conversão de açúcares redutores. A sacarificação e fermentação separada demonstrou maior eficiência em comparação ao processo de sacarificação e fermentação simultânea, apresentando melhor conversão de açúcares utilizando o coquetel enzimático Cellic CTec2[®]. O hidrolisado enzimático submetido à sacarificação e à fermentação, separadamente, com *Saccharomyces cerevisiae* apresentou um $Y_{P/S}$ de 0,50 com 2,62g/L de álcool no mosto fermentado. Os dados obtidos indicaram que a Aguapé avaliada apresenta elevado potencial para produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chaves: Biomassa lignocelulósica, bioetanol, Aguapé, Pré-tratamento.

ABSTRACT

The water hyacinth is an aquatic macrophyte plant considered as lignocellulosic biomass. The chemical composition of the water hyacinth is presented in considerable contents of cellulose and hemicellulose, and low levels of lignin, which constitutes a potential substrate for the production of ethanol. The present study aims to develop a technology for the production of ethanol of second generation from the biomass of Aguapé. In order to reach the proposed objectives, the chemical characterization of the Aguapé biomass was carried out afterwards, acid and alkaline pretreatment stages, optimization of the pretreatment acid saccharification, fermentation and distillation. Initially, the centesimal composition of the Aguapé was determined, indicating the presence of 32.50% cellulose, 28.61% hemicellulose and 7.46% lignin. Among the different forms of pre-treatment analyzed, the acid pretreatment presented better performance in the saccharification process, presenting approximately 46.16% yield in the conversion of reducing sugars. The optimization of the acid pretreatment was applied a Factorial Planning through a central rotational compound design. The STATISTICA Version 8.0 program (Statsoft Inc., Tulsa,) was used for data analysis. Pretreatment with dilute sulfuric acid resulted in the removal of at least 81% of the hemicellulose present in the water and 87% of the conversion of reducing sugars. The Saccharification and Separate Fermentation showed higher efficiency compared to the Saccharification and Simultaneous Fermentation process, presenting better conversion of sugars using the Cellic CTec2[®] enzymatic cocktail. The enzymatic hydrolyzate submitted to saccharification and separated fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* presented $Y_{P/S}$ of 0.50 with 2.62 g/L of alcohol in the fermented mash. The obtained data indicated that the evaluated Aguapé presents high potential for the production of second generation ethanol.

Keywords: Lignocellulosic biomass, bioethanol, Aguapé, Pretreatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos, os quais são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina.....	21
FIGURA 2 – Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre a celulose com geração de glicose.....	26
FIGURA 3 – Esquema do efeito do pré-tratamento na estrutura dos materiais lignocelulósicos.....	28
FIGURA 4 – Representação esquemática da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica.....	29
FIGURA 5 – Via metabólica de fermentação de etanol em <i>S. cerevisiae</i>	31
FIGURA 6 – Representação esquemática do processo de fermentação e hidrólise separada (SHF).....	32
FIGURA 7 – Representação esquemática do processo de fermentação e hidrólise simultânea (SSF).....	33
FIGURA 8 – Imagem microscópica das células de <i>S. cerevisiae</i>	35
FIGURA 9 – Planta macrófica Aguapé (<i>Eichhornia crassipes</i>) presentes no reservatório da Usina Hidrelétrica de Baguarí-MG.....	36
FIGURA 10 – Imagem aerea da Usina hidrelétrica de Buagarí-MG.....	38
FIGURA 11 – Fluxograma das etapas de coleta e caracterização química da Aguapé (<i>Eichhornia crassipes</i>).....	39
FIGURA 12 – Representação gráfica das curvas analíticas para o ensaio de dosagem de Amido e AST. Segundo método descrito por McCready (1950).....	46
FIGURA 13 – Fluxograma das etapas de obtenção do hidrolisado e produção de etanol de segunda geração a partir da Aguapé (<i>Eichhornia crassipes</i>).....	47
FIGURA 14 – Aspecto da biomassa de Aguapé <i>in natura</i> após tratamento ácido e a após tratamento ácido seguinte de tratamento básico.....	48
FIGURA 15 – Fermentômetro utilizado para condução do processo fermentativo o qual permite saída de CO ₂ sem permitir a entrada de ar (<i>sistema air lock</i>).....	53
FIGURA 16 – Porcentagem de açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise enzimática com enzima Celluclast® no período de 16 horas na condição Biomassa total.....	58

FIGURA 17 – Porcentagem de açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise enzimática com enzima Celluclast® no período de 16 horas na condição Biomassa por concentração de celulose.....	58
FIGURA 18 – Porcentagem de açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise enzimática com enzima Celluclast® no período de 16 horas nas condições de biomassa total e concentração de celulose *(p<0,05).....	59
FIGURA 19 – Porcentagem de açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise enzimática com enzima Celluclast® no período de 16 horas utilizando Aguapé após diferentes tipos de pré-tratamento (ácido, básico e ácido+básico).....	60
FIGURA 20- Porcentagem de açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise enzimática com enzima Cellic CTec2® no período de 16 horas utilizando Aguapé após diferentes tipos de pré-tratamento (ácido, básico e ácido+básico).....	60
FIGURA 21 – Porcentagem de açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise enzimática com as enzima Cellic CTec2® e Celluclast® no período de 16 horas utilizando massa seca de Aguapé após pré-tratamento ácido (H ₂ SO ₄) *p<0,05.....	61
FIGURA 22 – Gráfico de Pareto apresentando os efeitos dos fatores de respostas, em percentual de açúcares redutores sobre o processo de hidrólise ácida da Aguapé.....	66
FIGURA 23 – Gráficos de superfície de resposta para o percentual de açúcares redutores (AR%) removidos da torta de dendê em função dos efeitos combinados do tempo, concentração de H ₂ SO ₄ e Razão S/L (razão sólido-líquido).....	67
FIGURA 24 –. Análise de difração de raio-X da massa seca de Aguapé antes e após pré-7tratamento com ácido sulfúrico otimizado (H ₂ SO ₄ 5% v/v).....	69
FIGURA 25 – Análise da massa seca de Aguapé antes (A/B) e após pré-tratamento ácido otimizado (C/D) por MEV (Microscopia eletrônica por varredura) na ampliação de 50x (A e C) e 500x (B e D).....	70
FIGURA 26 – Porcentagem de açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise enzimática com as enzima Cellic CTec2® e Celluclast® no período de 16 horas utilizando Aguapé após otimização do pré-tratamento ácido (H ₂ SO ₄) combinado ao tratamento alcalino *p<0,05.....	72
FIGURA 27 – Produção de etanol obtidos com base no desprendimento de gás carbônico (CO ₂) durante os processos fermentativos (SSF e SHF) de meios provenientes do hidrolisado de Aguapé pré-tratada.....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Delineamento Composto Central Rotacional com dois níveis, 3 fatores (concentração de H ₂ SO ₄ , razão sólido líquido e tempo em minutos), 6 pontos axiais e 4 pontos centrais (15C, 16C, 17C, 18C), autoclavados a 1 atm a 120 °C.....	49
TABELA 2 – Composição química da Aguapé <i>in natura</i>	56
TABELA 3 – Porcentagem das frações de celulose, hemicelulose e lignina em diferentes estudos.....	57
TABELA 4 – Caracterização da Aguapé após diferentes tipos de pré-tratamento, porcentagem de rendimento na conversão de AR e de perda de biomassa após sacarificação com a enzima Cellic Ctec2®	62
TABELA 5 – Delineamento Composto Central Rotacional, do tipo 2 ³ com dois níveis de variações, 3 fatores (concentração de H ₂ SO ₄ , razão S/L e tempo de hidrólise), 6 pontos axiais e 4 pontos centrais (15C, 16C, 17C, 18C), autoclavados à 1 atm a 120°C, com os respectivos fatores de resposta para o pré-tratamento ácido da massa seca de Aguapé.....	63
TABELA 6 – Análise dos efeitos principais e de interações das variáveis do planejamento composto central para os percentuais de AR encontrados na Aguapé.	65
TABELA 7 – Comparação das frações de carboidratos e lignina do Aguapé (<i>Eichhornia crassipes</i>) antes e após o pré-tratamento ácido.	67
TABELA 8 – Índice de cristalinidade do Aguapé pré-tratado calculado pela Equação 12.	69
TABELA 9 – Açúcares redutores obtidos em pré-tratamento ácido, g/100g de massa seca....	71
TABELA 10- Variáveis dos processos fermentativos (SSF e SHF) utilizando como agente fermentativo a levedura <i>S. cerevisiae</i> após os pré-tratamentos ácido otimizado e posterior sacarificação enzimática.....	73

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

AFEX - Ammonia fiber explosion

AR- Augar redutor

ATP – Adenosina trifosfato

BG- β -glicosidases

DCCR- Delineamento Composto Central Rotacional

DRX- Difracção de Raio-X

Elev-Elevação

EnG- Endoglucanases

ExG- Exoglucanases

FPU- Filter Paper Activity

HMF- Hidroximetilfurfural

ha- Hectare

IC-ndice de cristanilidade

INPM - Instituto Nacional de Pesos e Medida.

Kg-Kilograma

mL-Mililitros

MS - Ministério da Saúde

MEV -Microscopia Eletrônica de Varredura

OCDE - Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econmicos

OMS - Organização Mundial da Saúde

pH- pontes de hidrogênio.

S/L–Sólido-líquido

SHF- Hidrólise e Fermentação Separada

SSF-Hidrólise e Fermentação Simultânea

μ m-micrometro

AST-Aucres solúveis totais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1 O etanol como fonte energética.....	18
3.2 O etanol lignocelulósico.....	20
3.2.1 Celulose.....	22
3.2.2 Hemicelulose.....	23
3.2.3 Lignina.....	23
3.3 Sacarificação enzimática.....	24
3.4 Pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas.....	26
3.5 Pré-tratamento ácido.....	28
3.6 Pré-tratamento alcalino.....	30
3.7 Fermentação da biomassa lignocelulósica.....	30
3.8 Integração entre sacarificação e fermentação.....	32
3.8.1 Sacarificação e Fermentação Separada (SHF).....	32
3.8.2 Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF).....	33
3.9 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
3.10 A biomassa Aguapé (<i>Eichhornia crassipes</i>).....	35
3.11 A biomassa de Aguapé como fonte de produção de etanol de 2ª geração.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Coletas da amostra de Aguapé <i>Eichhornia crassipes</i>	38
4.2.1 Determinação do teor de umidade da amostra íntegra.....	40
4.3 Determinação do teor de matéria seca.....	40
4.4 Determinação do teor de cinzas.....	40
4.5 Determinação do teor de lipídeos.....	41
4.6 Determinação do teor de proteína.....	41
4.7 Determinação do teor de fibra bruta.....	42
4.8 Determinação do teor de fibra solúvel em detergente ácido (FSDA).....	42
4.9 Determinação do teor de fibra solúvel em detergente neutro (FSDN).....	43

4.10	Determinação do teor de celulose.....	44
4.11	Determinação do teor de lignina.....	44
4.12	Determinação do teor de hemicelulose.....	45
4.13	Determinação do teor de açúcares solúveis totais (AST) e amido	45
4.14	Determinação de açúcares redutores (AR)	46
4.15	Obtenção do hidrolisado	46
4.16	Pré –tratamento ácido	47
4.17	Pré-tratamento alcalino.....	48
4.18	Otimização do processo de pré-tratamento ácido.....	48
4.19	Difração de Raio-X (DRX)	50
4.20	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	50
4.21	Seleção da melhor condição de pré-tratamento ácido	51
4.22	Sacarificação enzimática	51
4.23	Processo fermentativo.....	52
4.23.1.	Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF).....	53
4.23.2.	Sacarificação e Fermentação Separada (SHF).....	54
4.24	Determinação do teor de etanol	55
4.25	Análise estatística	55
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	Caracterização química da massa seca de Aguapé.....	56
5.2	Sacarificação enzimática da biomassa de Aguapé	57
5.3	Sacarificação enzimática da biomassa de Aguapé com diferentes tipos de pré-tratamento.	59
5.4	Planejamento experimental DCCR para a otimização do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído.....	63
5.5	Análise de Difração de Raio-X (DRX)	68
5.6	Análise da massa seca de Aguapé antes e após pré-tratamento ácido por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	69
5.7	Sacarificação enzimática após a otimização do pré-tratamento	70
5.8	Fermentação.....	71
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
7.	REFERÊNCIAS	75

1. INTRODUÇÃO

O consumo de combustíveis fósseis, como o petróleo, apresenta forte expansão a nível mundial. Entretanto, as políticas de preservação ambiental têm priorizado reduzir o consumo desses combustíveis no intuito de evitar o surgimento de consequências negativas como as mudanças climáticas, o aquecimento global e demais danos ambientais (TASNIM *et al.*, 2017). Deste modo, o desenvolvimento tecnológico e industrial contribui para que se busque ampliação da oferta de combustíveis. Porém, crescem também as preocupações com a sustentabilidade e o meio ambiente (ZHUANG *et al.*, 2016; NEGAHDAR *et al.*, 2016).

O cenário mundial frente às adversidades do emprego de combustíveis fósseis, apresenta a necessidade de estimular o desenvolvimento de novas tecnologias para obtenção de fontes alternativas de combustíveis. O etanol tem se mostrado uma das melhores alternativas para a redução do uso de combustíveis derivados do petróleo e, nesse contexto, o Brasil se destaca mundialmente pelo pioneirismo na produção do etanol combustível a partir do caldo da cana-de-açúcar (BAEYENS *et al.* 2015). No intuito de garantir o abastecimento energético através do etanol faz-se necessário implantar alternativas como aumento da área de plantio, aperfeiçoamento do processo de produção já existente, melhoramento genético da cana-de-açúcar e de microrganismos fermentadores, e também pelo desenvolvimento de conversão dos resíduos agroindustriais lignocelulósicos em fontes de açúcares fermentáveis (ZHOU *et al.*, 2016).

A necessidade de grandes áreas para o cultivo da cana-de-açúcar e os problemas associados à destinação de seus produtos tornaram os resíduos agrícolas e subprodutos agroindustriais em uma alternativa de muito interesse por seu potencial como biomassa energética. Com isso, desenvolveu-se a tecnologia para a produção do etanol de segunda geração, na qual a celulose presente na estrutura desses materiais é hidrolisada a açúcares fermentescíveis com a finalidade de produzir etanol (NEVES *et al.*, 2016).

A biomassa lignocelulósica, principal matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração, é composta de celulose, hemicelulose e lignina, além de outros componentes em menores quantidades. O bagaço da cana-de-açúcar, um exemplo de biomassa lignocelulósica, é fortemente recalcitrante, devido à forte ligação existente entre a celulose hemicelulose e lignina. Para utilizá-la na produção de etanol, é necessário submeter o material a várias etapas de processamento: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação. Os processos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos podem ser térmicos, químicos,

físicos, biológicos ou uma combinação de todos esses, o que dependerá do grau de separação requerido e do fim proposto (VERARDI *et al.*, 2016).

A planta aquática Aguapé é considerada como uma fonte promissora de biomassa energética principalmente pelo seu rápido crescimento. A Aguapé trata-se de uma planta macrófita aquática, originária da América do Sul bastante conhecida pelo seu rápido crescimento e os problemas ambientais que a mesma provoca. O crescimento da Aguapé ocorre em águas ricas em nutrientes, temperatura e pH. Seu crescimento promove o desenvolvimento de tapetes densos dificultando a passagem de luz para as plantas, reduzindo o oxigênio na água e tornando os ecossistemas menos férteis (DAS *et al.*, 2016).

A composição química da biomassa de Aguapé muito favorável à produção de biocombustíveis. A Aguapé, por se tratar de uma fonte de biomassa lignocelulósica, é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Outro aspecto característico desta planta são seus altos teores de hemicelulose e celulose e baixo teor de lignina, o que configura como uma excelente matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração (ZHANG *et al.*, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Objetivou-se o desenvolvimento de uma metodologia para produção de etanol de 2ª geração utilizando como matéria-prima a Aguapé (*Eichhornia crassipes*).

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar a biomassa de Aguapé e estimar o potencial energético;
- ✓ Avaliar o processo de pré-tratamento ácido/alcalino da Aguapé por meio da otimização dos tratamentos considerando à concentração, temperatura tempo e razão sólido/líquido;
- ✓ Avaliar a melhor eficiência da digestibilidade enzimática utilizando duas enzimas comerciais; e
- ✓ Avaliar o processo de fermentação da biomassa de Aguapé para a produção de etanol utilizando fermento biológico (*Saccharomyces cereviasae*) comercial.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O etanol como fonte energética

O etanol, também denominado álcool etílico (C_2H_5OH) é produzido desde os tempos antigos pela fermentação dos açúcares encontrados em produtos vegetais. Ainda hoje, grande parte do etanol industrial é obtida por processo fermentativo, embora também possa ser produzida através de via sintética e de hidrocarbonetos não saturados como o eteno, derivado do petróleo (PUBCHEM, 2017).

O etanol na forma anidro ou absoluto (absolute or anhydrous alcohol), 99,3 °INPM, pode ser destinado para aplicações industriais como reativo, solvente, na fabricação de aerossóis (produtos farmacêuticos, fungicidas, inseticidas) (NOVA CANA, 2017). Entretanto, a aplicação mais empregada do álcool anidro é como combustível, na forma de aditivo para gasolina, atuando principalmente no melhoramento da combustão, pelo aumento da octanagem devido a presença de um átomo de oxigênio em sua estrutura molecular, reduzindo a formação de monóxido de carbono durante a reação de queima (ZARPELON, 2017). No Brasil a adição do etanol é obrigatória, de no mínimo 27% v/v na gasolina (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2015).

O combustível etanol tem sido considerado uma alternativa para minimizar problemas ambientais e energéticos no mundo em razão da escassez e alta dos preços dos combustíveis fósseis e da poluição por eles causada. Em comparação aos combustíveis fósseis, o etanol apresenta as vantagens de ser uma fonte renovável de energia, e de também contribuir para a redução das emissões de dióxido de carbono (SINGH, *et al.*, 2015.)

O Brasil encontra-se em uma posição favorável no que se refere à produção de etanol, por apresentar vantagens na tecnologia de produção, possibilidade de liderança na agricultura de energia e mercado de biocombustíveis sem ampliar a área desmatada ou reduzir a área destinada à produção de alimentos, diversidade de matérias-primas em diferentes biomas. Além disso, a matriz energética brasileira já é um exemplo de sustentabilidade, pois enquanto a média mundial é o uso de apenas 13,5% de fontes renováveis, o Brasil utiliza atualmente cerca de 43,5% destas fontes (BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL, 2016).

A cana-de-açúcar para produção de álcool é o insumo que garante a maior produtividade com custo de produção consideravelmente inferior ao etanol produzido nos demais países. O custo de produção do etanol brasileiro é de US\$ 0,22/L contra US\$ 0,35/L para esse combustível produzido pelos Estados Unidos, a partir do milho, por exemplo, (LIMA

et al., 2013). Portanto, o Brasil e os Estados Unidos produzem o etanol a partir de cana-de-açúcar e milho, respectivamente, sendo os maiores produtores mundiais e juntos respondem por 89% da produção global. De acordo com a Associação de Combustíveis Renováveis, a produção de etanol foi de 26,58 e 27,05 bilhões de galões nos anos de 2016 e 2017, respectivamente (KOHLENER, 2019), representando 55% da produção mundial.

No Brasil, 43,5% da energia fornecida são de origem renovável, uma das maiores proporções mundiais, contrastando significativamente com a média mundial, de 13,5%, e mais ainda com a média dos países que compõem a Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômicos (OCDE), em sua grande maioria países desenvolvidos de apenas 9,4% (EPE, 2018). Um dos fatores importantes para o estímulo ao consumo de fonte energética renovável como o etanol, foi a implantação da tecnologia flex-fuel nos carros brasileiros.

O cenário automotivo associado a outras políticas de incentivo ao consumo de etanol como a Lei 13.576/2017 da Política Nacional de Biocombustíveis (Renovabio), são fatores estimuladores ao aumento da produção etanol no Brasil (EPE, 2018). A elevada produtividade do etanol de cana-de-açúcar, com uma média de 3,5 a 7 mil litros por hectare (MAPA, 2017), garante um produto competitivo e atrativo para sua comercialização no mercado internacional, acrescentando ainda a tendência de redução dos custos de transporte.

Os fatores econômicos e ambientais contribuem significativamente para o consumo de etanol como fonte energética. Trata-se de um produto renovável com características combustíveis, que contribui para a redução do efeito estufa e diminui substancialmente a poluição do ar, minimizando os seus impactos na saúde pública. Atualmente, este é o principal biocombustível empregado mundialmente, correspondendo por 12% da energia mundial. No entanto, estimativas indicam que a utilização mundial do mesmo será de 25% em 2050 (MONOCHIO, 2017). As vantagens proporcionadas pela utilização de etanol estimulou uma busca mundial por novas fontes de obtenção deste combustível como energia renovável (FAGUNDES, *et al.*, 2016).

Esse cenário contribuiu para o desenvolvimento de técnicas e utilização de novos subprodutos para a obtenção do etanol de segunda geração. Atualmente, pesquisas em laboratório estão voltadas para utilização de alguns destes subprodutos, o bagaço e a palha da cana-de-açúcar (gerado em grande quantidade pela agroindústria brasileira), madeira e outras biomassas lignocelulósicas como o Agupapé, podem ser utilizados como alternativa econômica para produção de biocombustível em um processo que envolve várias etapas, tais como, pré-tratamento, hidrólise e fermentação alcoólica (DAS *et al.*, 2016).

O etanol de segunda geração representa uma alternativa para o uso energético da biomassa, apresentando vantagens ambientais e econômicas, por ser o etanol produzido a partir de lignocelulose, presente em resíduos de origem vegetal. Utilizando-se de técnicas específicas para a obtenção do etanol de segunda geração a partir da composição lignocelulósica, estima-se que a partir de um bilhão de toneladas de biomassa seca com 35 a 45% de celulose e 20 a 30% de hemicelulose, submetidos a hidrólise e fermentação poderiam ser produzidos cerca de 100 bilhões de litros de bioetanol 2G (SARKAR *et al.*, 2012).

3.2 O etanol lignocelulósico

As biomassas lignocelulósicas constituem o material mais abundante em nosso planeta, tornando-se atrativas para a produção do etanol, assim como para outros biocombustíveis. Vários processos têm sido desenvolvidos utilizando-o como substrato para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como: proteínas, microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos (ZHENG *et al.*, 2017).

Os compostos lignocelulósicos são constituídos basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, além de pequenas quantidades de outros componentes. O material lignocelulósico apresenta seus componentes arranjados de forma que as cadeias de celulose e hemicelulose sejam fixadas pela lignina. Paralelamente, as cadeias de celulose se mantêm compactas através das ligações de hidrogênio lignina que promovem a rigidez da planta, enquanto a lignina circundante fixa os componentes e age como uma barreira física para o ataque dos microrganismos e-ou enzimas e a água. A hemicelulose, por sua vez, proporciona a ligação entre a celulose e a lignina formando assim a rede fibrosa (NANDA, 2013). As concentrações desses constituintes na biomassa variam muito de uma espécie vegetal para outra, ou até mesmo, dentro da mesma espécie (Figura 1).

Diante disso, os dois maiores obstáculos para impedir a hidrólise da celulose de materiais lignocelulósicos são a recalcitrância da celulose cristalina, proveniente da estrutura linear das cadeias de celulose compactadas em microfibrilas, e a alta proteção que a lignina proporciona a estrutura celulósica, atuando como uma barreira física contra o ataque enzimático (ADITIYA *et al.*, 2016).

A produção do etanol de segunda geração envolve quatro principais etapas: inicia-se pelo pré-tratamento da biomassa, seguido da hidrólise com produção de açúcares simples, que serão levados para a etapa de fermentação e, em seguida a separação do produto pelo processo

de destilação (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). O pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos visa aumentar a área superficial da celulose e reduzir sua cristalinidade, uma vez que esta se encontra envolvida por camadas de lignina e hemicelulose. Realizar a hidrólise da biomassa nativa sem a etapa de pré-tratamento significa obter um rendimento inferior a 20% no processo devido às suas características estruturais como cristalinidade, porosidade, superfície de contato e revestimento por lignina e hemicelulose (IROBA e TABIL, 2013).

A etapa de hidrólise consiste na degradação das cadeias poliméricas da celulose em monômeros de glicose. Há dois principais tipos de hidrólise, a ácida e a enzimática. A ácida envolve um catalisador ácido e sua conversão é rápida, sendo necessário um minucioso controle da reação com o objetivo de evitar a formação de produtos indesejáveis e inibidores do processo. Na hidrólise enzimática o catalisador é de origem biológica, os quais possuem ações altamente específicas sendo necessário um controle específico do meio de reação (SANCHES & GOMEZ, 2014).

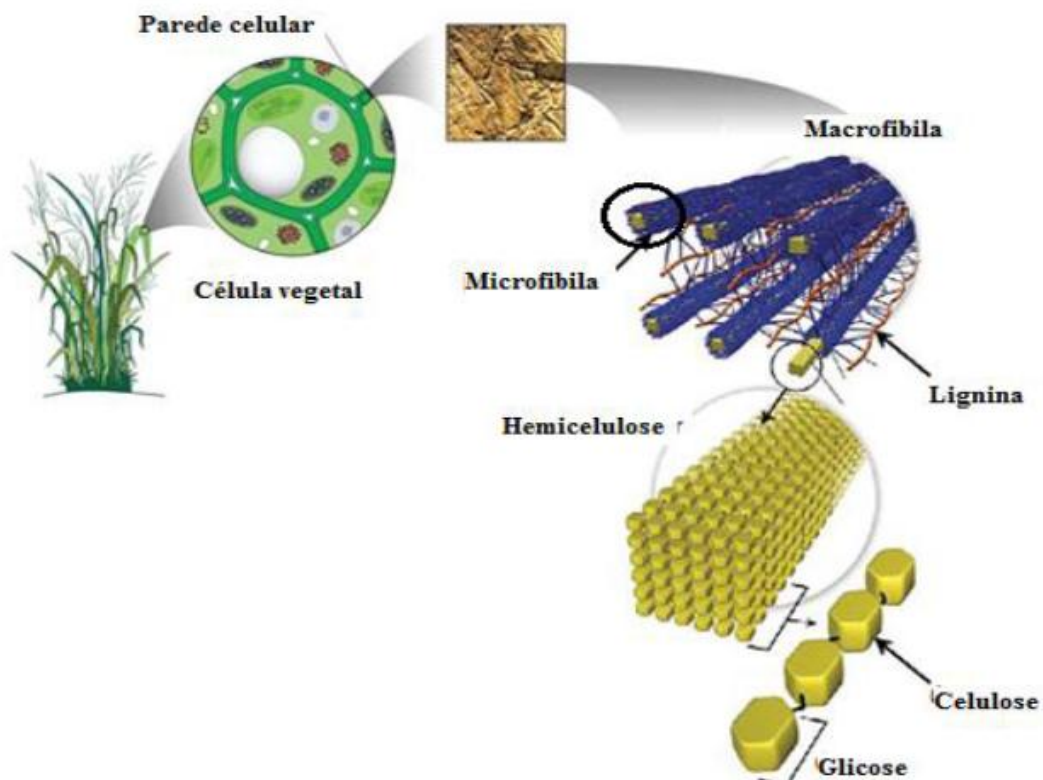


FIGURA 1- Estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos, os quais são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina. Fonte: Adaptado de CANILHA *et al.*, (2010).

3.2.1 Celulose

A celulose é um polímero de glicose unidos por ligações β (1-4), insolúvel em água, muito resistente à hidrólise enzimática e encontrado tanto em vegetais primitivos quanto em plantas mais evoluídas (JUTURO; WU, 2014). Este composto orgânico que se constitui como o principal polissacarídeo estrutural das paredes de células vegetais. A celulose corresponde aproximadamente 40% de toda reserva de carbono disponível no vegetal. Sua concentração pode variar de 20 a 99% e está presente em todos vegetais, desde os mais simples até os de maior complexidade (UMMARTYOTIN; MANUSPIYA, 2015). Em sua estrutura, as fibras de celulose apresentam regiões altamente ordenadas, estabilizadas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, e áreas menos ordenadas ou amorfas, onde as cadeias apresentam uma organização randomizada.

As ligações intermoleculares, que ocorrem entre unidades de glicose moléculas adjacentes são responsáveis pela rigidez na parede, já as intramoleculares que ocorrem entre unidades de glicose são responsáveis pelas formações das fibrilas, que são estruturas altamente ordenadas que se associam formando as fibras de celulose. Uma importante característica da celulose, não usual entre os polissacarídeos, é a sua estrutura cristalina regular, natureza que lhe confere grande resistência física e alguma resistência à biodegradação (YOON *et al.*, 2014). As fibrilas apresentam regiões com alto grau de cristalinidade e outras com menor grau de ordenação, as chamadas regiões amorfas. Nas regiões cristalinas as fibras são mais resistentes mecanicamente e aos processos de alongamento e solvatação, em comparação à região amorfa que apresenta maior flexibilidade.

Existem propriedades importantes para a classificação das celulosas, como o grau de polimerização e o índice de cristalinidade. O grau de polimerização indica a frequência de ligações disponíveis para a ação das celulasas e pode ser definido de acordo com o número médio de monômeros e o peso molecular do polímero. Toda via, o índice de cristalinidade está relacionado diretamente com a reatividade do substrato (SUN *et al.*, 2016). Este conjunto de características associado à lignina compõe uma macromolécula altamente resistente à hidrólise, constituindo assim, um fator limitante ao emprego da biomassa lignocelulósica em diversas aplicações.

3.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um polímero de baixo peso molecular composta por pentoses, hexoses e ácido urônico e mais susceptível hidrólise se comparada a celulose, uma vez que apresenta menor grau de polimerização. Este polímero constitui-se como um heteropolissacarídeo que participa junto com celulose da formação das paredes de células vegetais. A hemicelulose apresenta massa molecular mais baixa do que a celulose e inclui uma grande variedade de polissacarídeos com estruturas lineares e/ou ramificadas que são classificados de acordo com o monossacarídeo mais abundante que os compõem (MANIVANNAN *et al.*, 2012). Dentre esses monossacarídeos podemos identificar os compostos: xilana, manana, galactana e arabinana. As hemiceluloses são intimamente associadas com a lignina e celulose, além de interagirem covalentemente com a pectina. O componente dominante das angiospermas, plantas agrícolas como o capim e resíduos como palhas é a xilana, enquanto que o das gimnospermas é a glucomanana (SILVA *et al.*, 2015)

O principal componente da hemicelulose é a xilana, considerada também como o segundo mais abundante polissacarídeo natural existente. A xilana geralmente apresenta-se localizada entre a molécula de lignina e o conjunto de fibras de celulose, portanto constitui-se como uma macromolécula com a cadeia principal composta por resíduos de β -xilopiranoses unidos através de ligação glicosídica do tipo β (1-4) (LAGAERT *et al.*, 2014). Outro aspecto importante aplica-se à heterogeneidade da estrutura da xilana, sua degradação requer ação de várias enzimas, ou seja, de um sistema enzimático para a liberação de xilose a partir de clivagem das ligações glicosídicas, denominado sistema xilanolítico (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). As enzimas xilanases são produzidas principalmente por micro-organismos para a degradação da parede celular de plantas. Dentre as fontes microbianas, os fungos filamentosos são especialmente interessantes, uma vez que a secreção destas enzimas para o meio possui níveis muito mais elevados que aqueles secretados por leveduras e bactérias (YANG *et al.*, 2015).

3.2.3 Lignina

A lignina é uma substância hidrofóbica, com estrutura tridimensional e amorfa, altamente ramificada. Sua estrutura polimérica configura como a substância orgânica mais abundante nas plantas depois da celulose. Sua estrutura é bem mais complexa em comparação à celulose e hemicelulose, isso é observado através da presença de diversas unidades

precursoras e ao grande número de combinações possíveis entre as mesmas (ZHENG *et al.*, 2017). A lignina possui uma elevada massa molecular, e é formada a partir da junção de vários ácidos e alcoóis fenilpropílicos (p-cumarílico, coniferílico e sinapílico) (PACHECO, 2011).

O grau de solubilidade da lignina varia em função do tipo de material lignocelulósico e das condições hidrolíticas empregadas. As relações de interação entre lignina, celulose e hemicelulose são fatores determinantes na estruturação da parede celular dos materiais lignocelulósicos, A íntima associação entre as três frações citadas é tal que impõe dificuldades para a recuperação dos açúcares constituintes na forma de monômeros com elevado grau de pureza (MOOD *et al.*, 2013).

No intuito de otimizar a utilização da celulose e/ou hemicelulose presentes na parede celular vegetal, tanto por micro-organismos ou em processos biocatalíticos requer o uso de ferramentas para o fracionamento da lignina, as quais promovem o aumento da disponibilidade destes polissacarídeos ao ataque enzimático (UMMARTYOTIN; MANUSPIYA, 2015).

O processo de deslignificação compreende a retirada parcial ou total das frações de lignina com o intuito de facilitar o acesso microbiano aos açúcares fermentescíveis. A remoção de lignina é um fator preponderante para melhorar a digestibilidade enzimática das biomassas lignocelulósicas. A digestibilidade enzimática consiste no mecanismo de bioconversão dos açúcares fermentescíveis em etanol. Segundo estudos realizados por Frydendal-Nielsen *et al.*(2017), a biomassa de *Miscanthus* que apresentavam 53% de digestibilidade em 24 horas obtiveram um aumento de 86 a 96% nos rendimentos de glicose através hidrólise enzimática após a deslignificação em mesmo período. Neste intuito, diferentes tecnologias têm sido empregadas para obtenção de produtos químicos e combustíveis a partir dos componentes de biomassa lignocelulósica. A conversão bioquímica é usada para processar os componentes açúcares da celulose e hemicelulose para convertê-los em etanol pela fermentação (SURENDRA, KHANAL, 2015).

3.3 Sacarificação enzimática

A sacarificação enzimática ou hidrólise do material lignocelulósico constitui-se em um passo fundamental no processo de produção de etanol. O objetivo principal deste processo concentra-se em possibilitar a conversão da celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis que poderão ser convertidos a etanol por ação microbiológica. A presença de hemicelulose e lignina dificultam o acesso dos reagentes de hidrólise à celulose, reduzindo a eficiência desta etapa.

Diante disso, a remoção destes compostos aumenta a porosidade do material, melhorando significativamente o processo de hidrólise. Os diferentes processos de pré-tratamento dependem do material utilizado e da finalidade proposta de utilização das frações dos materiais lignocelulósicos. O pré-tratamento proporciona uma mudança na estrutura morfológica da biomassa, tornando a celulose mais acessível ao ataque de enzimas ou produtos químicos para a produção de açúcares fermentescíveis. (TIMUNG *et al.*, 2015; EBRAHIMI *et al.*, 2017). Entretanto, o atual emprego de enzimas comerciais neste processo, denominado sacarificação enzimática, apresenta alto custo, o que torna a produção do etanol de segunda geração mais onerosa (LIAO *et al.*, 2015). Toda via, existem pesquisas para o desenvolvimento tecnológico de obtenção de etanol lignocelulósico utilizando enzimas de baixo custo, como por exemplo, através da seleção de micro-organismos produtores de hidrolases provenientes de resíduos agroindustriais e pela otimização de processos.

Um conjunto enzimático bastante empregado nos processos de sacarificação enzimática são as celulasas. As celulasas são classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (KUMAR *et al.*, 2016).

A atuação deste complexo de enzimas ocorre sinergicamente na hidrólise da cadeia de celulose de forma mais eficaz. Esta atuação sinérgica acontece da seguinte maneira: as endoglucanases atuam de maneira aleatória na cadeia celulósica, diminuindo o grau de polimerização, produzindo celuoligossacarídeos aumentando o número de sítios de ataque para as exoglucanases. Por sua vez, as exoglucanases hidrolisam a cadeia celulósica a partir de suas extremidades, liberando principalmente moléculas de celobiose. As β -glicosidases, por sua vez, promovem a hidrólise da celobiose à glicose e podem também clivar unidades glicosídicas a partir celuoligossacarídeos, aliviando problemas de inibição de outras enzimas (Figura. 2) (ADITIYA *et al.*, 2016).

A maior capacidade dos microrganismos ou enzimas em hidrolisar os materiais lignocelulósicos para a conversão de glicose reflete no que podemos considerar como maior digestibilidade da biomassa. Um dos fatores primordiais para viabilizar a ação microbiológica sobre a biomassa lignocelulósica são os processos de pré-tratamento das fibras celulósicas proporcionando maior superfície de contato para a ação enzimática (RASTOGI, SHRIVASTAVA, 2017).

O pré-tratamento deve ser eficiente do ponto de vista energético e químico e vários critérios devem ser considerados, como preservar a fração de hemiceluloses, evitar a degradação ou perda de celulose, bem como a formação de compostos inibidores ao crescimento de microrganismos da fermentação e minimizar os custos. A geração de lignina de alto valor agregado também pode ser um parâmetro de comparação entre os diversos tipos de pré-tratamento no custo das etapas posteriores de recuperação de produto também deve ser avaliado (MOHAPATRA *et al.*, 2017).

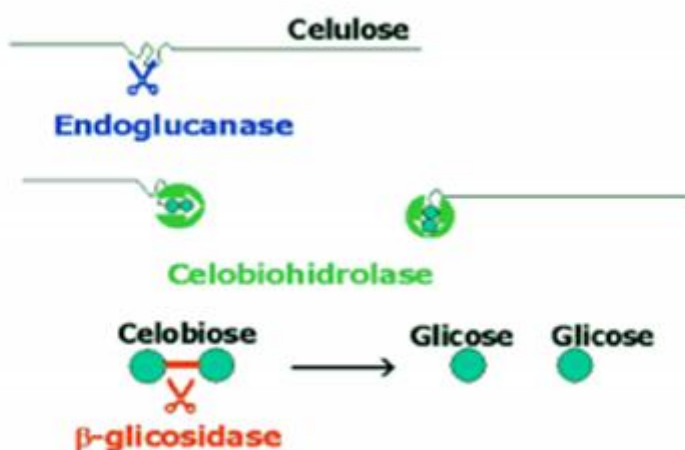


FIGURA 2- Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre a celulose com geração de glicose. Adaptação: Pitarelo,2012.

3.4 Pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas

O pré-tratamento tem por objetivo aumentar a área de superfície da biomassa, aumentar a porosidade dos materiais e reduzir a cristalinidade da celulose. Estas alterações promovidas na estrutura da biomassa permitem que a celulose se torne mais acessível à etapa subsequente que é a hidrólise enzimática (Figura 3). Além disso, um bom pré-tratamento deve preservar as pentoses para aumentar os rendimentos de etanol e evitar a formação de inibidores da fermentação (TOQUERO e BOLADO, 2014)

A biomassa quando hidrolisada na sua forma natural apresenta rendimentos muito baixos, menores que 20% (MOOD *et al.*, 2013). Isso ocorre porque a biomassa possui uma estrutura celular rígida, complexa e recalcitrante à decomposição devido às características estruturais dos tecidos vegetais e às interações de natureza físico-químicas estabelecidas entre a celulose, a hemicelulose e a lignina.

A celulose é constituída por regiões cristalinas e amorfas cujas proporções variam de um material para outro. A intensidade de frações cristalinas presentes na amostra pode ser representada pelo índice de cristalinidade. Essa característica influencia no comportamento físico e na reatividade do material, sendo que as regiões amorfas são mais susceptíveis à hidrólise enzimática devido ao arranjo mais desorganizado das moléculas e a maior distância entre as fibras, em comparação com as regiões cristalinas. Em geral, o índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos é alto, sendo interessante o uso de pré-tratamento que diminuam o índice de cristalinidade da celulose (PATEL *et al.*, 2017).

O processo de pré-tratamento altera de forma diferente a estrutura da biomassa. Os pré- tratamentos físicos, como a moagem e a extrusão não alteram a composição da biomassa, mas alteram a sua estrutura por meio do aumento da área superficial e redução da cristalinidade. Já os tratamentos alcalinos, oxidativos, biológicos e o AFEX (Ammonia fiber explosion) removem, principalmente, a fração da lignina, logo a biomassa será composta majoritariamente por hemicelulose e celulose ao final do processo. O tratamento ácido, explosão a vapor e LHW (Liquid Hot Water) removem a hemicelulose para a corrente líquida e forma uma corrente sólida rica em celulose e lignina. Diante disso,ressalta-se que o pré-tratamento escolhido define a composição da biomassa que será levada para a hidrólise (SILVA *et al.*, 2013).

A eficiência do pré-tratamento é avaliada baseada no desempenho da hidrólise. Em geral, um bom pré-tratamento proporciona altos rendimentos e taxas de hidrólise, não gera inibidores da fermentação, tem baixo custo, não apresenta perda de carboidratos ou degradação da biomassa, possibilita a recuperação da lignina e consome pouca energia (IBRAHIM, 2012).

Um fator importante se aplica aos efeitos que podem ser provocados pelo processo de pré-tratamento. Entretanto, caso o pré-tratamento se apresente em caráter muito drástico, ocorre degradação da fração celulósica, além formação de inibidores da fermentação, se for muito brando, a acessibilidade da enzima continuará sendo baixa. (BREXÓ e SANT'ANA, 2017). No primeiro problema apresentado pode-se realizar um tratamento do hidrolisado para remover alguns inibidores como o furfural e o hidroximetilfurfural, além do ácido sulfúrico e ácido acético, aplicando por exemplo, os métodos de overlime, eletrodialise e carvão ativo. A formação de furfural e HMF é decorrente da reação de desidratação da xilose e da glicose respectivamente. Esses compostos quando presentes no licor a ser fermentado podem danificar a parede celular dos micro-organismos bem como prolongar a fase “lag” de crescimento. (KARTAWIRIA *et al.*, 2015).

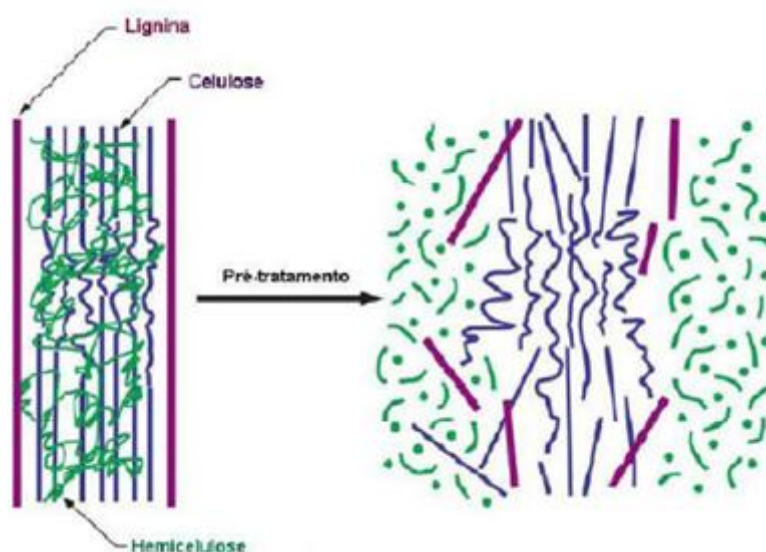


FIGURA 3- Esquema do efeito do pré-tratamento na estrutura dos materiais lignocelulósicos. Adaptado de Santos *et al*(2012).

3.5 Pré-tratamento ácido

O principal objetivo da hidrólise ácida baseia-se na quebra das moléculas de celulose, presentes nas biomassas lignocelulósicas, através da exposição às soluções ácidas. O catalisador ácido utilizado nesse tipo de hidrólise age rapidamente no processo de conversão da celulose em hexoses, e por isso, a reação deve ser controlada para evitar reações paralelas indesejáveis (RAVINDRAN e JAISWAL, 2016).

O tratamento com soluções ácidas necessita de prévia diluições com quantidades adequadas de água para que sua eficiência seja elevada. Isto porque, o ácido em meio aquoso dissocia-se formando o íon hidroxônio, o qual é transportado para o interior da biomassa a fim de promover a quebra das ligações glicosídicas (GUIRGEL, 2010; HAMELINCK, 2005).

A utilização de ácido diluído tem sido explorada na solubilização da hemicelulose, neste caso, os ácidos são utilizados como catalisadores no processo de solubilização. Dentre eles o ácido sulfúrico, clorídrico, fosfórico, fluorídrico e nítrico (RABEMANOLONTSOA *et al.*, 2016). A hemicelulose solubilizada pode ser recuperada na forma de seus monossacarídeos presentes no hidrolisado ácido, a fração sólida resultante da hidrólise apresenta celulose e lignina isoladas.

Um maior interesse na utilização destas soluções diluídas reside no benefício econômico proporcionado por este processo, já que o baixo consumo de ácido diminui os custos com matéria-prima e equipamentos, devido à menor corrosividade destes (REALES-ALFARO *et al.*, 2013). Entretanto, o uso de ácidos diluídos não proporciona um inchamento adequado da

região cristalina da celulose, o que leva a uma baixa taxa de conversão celulose-açúcar. Para se alcançar taxas aceitáveis de conversão da celulose à glicose, em tempos razoavelmente curtos e com o uso de ácidos diluídos, é necessário um incremento na pressão e na temperatura, devido à inacessibilidade aos cristalitos de celulose, o que provoca a degradação de uma quantidade considerável de açúcares e lignina solúvel, levando a um baixo rendimento da hidrólise e da fermentação (Figura 4) (PATEL, *et al.*, 2017).

Um das preocupações com o processo de hidrólise ácida são os subprodutos gerados, devido a exposição do ácido a altas temperaturas desestruturar as pentoses, favorecendo a liberação de furfural ou hexoses formadora dos hidroximetilfurfural, substâncias inibidoras do processo fermentativo (BREXÓ e SANT'ANA, 2017). O furfural pode ainda se degradar a ácido fórmico ou se polimerizar, e o HMF pode originar quantidades equimoleculares de ácidos fórmico e levulínico. Além do furfural, HMF e dos dois ácidos alifáticos (fórmico e levulínico) forma-se o ácido acético procedente da hidrólise dos radicais acetilas da hemicelulose, todos inibidores do processo fermentativo (KARTAWIRIA *et al.*, 2015).

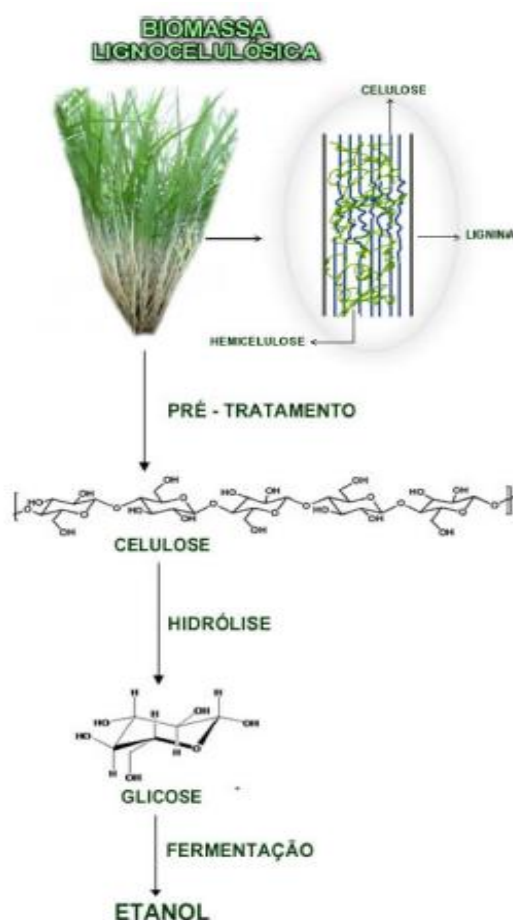


FIGURA 4 -Representação esquemática da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica. Fonte: Santos *et al.*, 2012.

3.6 Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino trata-se de um processo tecnológico que objetiva utilizar soluções alcalinas, tais como hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) ou hidróxido de amônia (NH₄(OH)), para remover a lignina e parte da hemicelulose, aumentando eficientemente a acessibilidade da enzima à celulose (ROMERO-GÜIZA *et al.*, 2017).

Os processos de pré-tratamento alcalinos geralmente utilizam condições de temperatura e pressão moderadas. Este processo em comparação aos sistemas de pré-tratamento ácidos são mais econômicos, degradam menos a celulose e apresentam menor formação de derivados do furano (CHEN, *et al.*, 2012). O efeito deste pré-tratamento depende do conteúdo de lignina presente no material, pois seu principal efeito consiste na remoção da lignina da biomassa, alterando a estrutura da celulose e promovendo maior reatividade da fibra, diminuição do grau de polimerização e cristalinidade, o que facilita a ação das enzimas celulolíticas (AKHTAR *et al.*, 2017).

3.7 Fermentação da biomassa lignocelulósica

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico, no qual os micro-organismos transformam os açúcares em etanol e CO₂. Este dissacarídeo é convertido em piruvato que sofre uma descarboxilação reduzindo o acetaldeído formado o etanol, outros compostos orgânicos tais como glicerol, ácido succínico, álcoois amílico e isoamílico são produzidos em menor quantidade e também são considerados produtos secundários da fermentação alcoólica (CHENG *et al.*, 2017).

A principal rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica por leveduras é a glicólise (rota Embden-Meyerhof-Parnas ou EMP), através desse processo cada molécula de glicose é oxidada e duas moléculas de piruvato são produzidas (Figura 5) (MOHAPATRA *et al.*, 2017). Em condições anaeróbias a molécula de piruvato é descarboxilada pela enzima piruvato descarboxilase para gerar acetaldeído e gás carbônico. O aldeído, em seguida, é reduzido em uma reação catalisada pela enzima álcool desidrogenase para produzir etanol (BERG *et al.*, 2012). Teoricamente, o rendimento é 0,511 g de etanol e 0,489 g de gás carbônico em relação a 1 g de glicose metabolizada. Dois ATPs (adenosina tri-fosfato) produzidos na glicólise são utilizados para direcionar a biossíntese de macromoléculas, o que envolve uma grande variedade de reações que requerem energia. Sem o consumo contínuo de ATPs pelas células em crescimento, o metabolismo glicolítico é interrompido imediatamente, pois o

acúmulo intracelular de ATP inibe a fosfofrutoquinase (PFK), uma das enzimas mais importantes envolvidas na regulação da glicólise (KOK *et al.*, 2012).

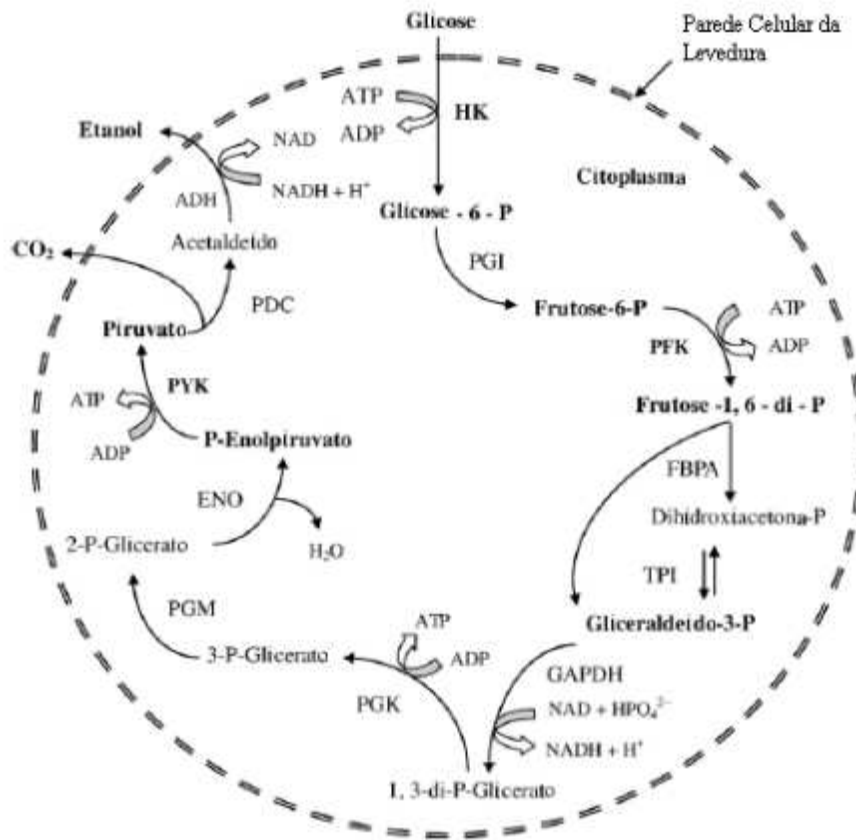


FIGURA 5 -Via metabólica da fermentação de etanol em *S. cerevisiae*. Adaptação de BAI, et al, 2008.

A glicose, oriunda da hidrólise da celulose, a qual é uma hexose (carboidrato com seis átomos de carbono) é o açúcar mais comum utilizado por micro-organismos como combustível para a produção de etanol (SASMAL, *et al*, 2018), no entanto o metabolismo de certos micro-organismos também permite a assimilação de pentoses (carboidratos com cinco átomos de carbono), como xilose e arabinose, oriundos da hidrólise da hemicelulose, para a produção de etanol (BRAR, *et al*, 2018), sendo a xilose o segundo açúcar fermentável mais presente em hidrolisados (SASAKI, *et al*, 2014).

A via fermentativa é a forma mais importante para a obtenção do álcool etílico no Brasil, devido ao grande número de matérias-primas naturais e residuais existentes que fornecem açúcares passíveis de fermentação microbiana. Na indústria, a fermentação é iniciada após as etapas de pré-tratamento e sacarificação dos polissacarídeos presentes nas biomassas vegetais, convertendo-os em moléculas de glicose ou outro açúcar fermentescível.

Alguns fatores são importantes para a maior eficiência do processo de fermentação como a qualidade da matéria-prima, pH da reação, nível de acidez, presença de microrganismos

contaminantes, temperatura, concentração de açúcares do meio e disponibilidade de nutrientes (RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017).

3.8 Integração entre sacarificação e fermentação

Na produção de etanol de segunda geração, diferentes configurações de processos podem ser definidas de acordo com a integração das etapas de hidrólise enzimática e fermentação. Os principais processos de integração são caracterizados pela Sacarificação e Fermentação Separada (SHF) e Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF).

3.8.1 Sacarificação e Fermentação Separada (SHF)

O processo de sacarificação e fermentação separada (SHF) utiliza o sólido resultante do pré-tratamento após ser submetido às etapas posteriores de lavagem para remoção dos inibidores, é conduzido à etapa de hidrólise enzimática pela adição de enzimas celulolíticas. O hidrolisado resultante é convertido em etanol por leveduras de fermentação convencionais ou outros micro-organismos em potencial (Figura 6). Nesse caso, os processos de hidrólise e fermentação podem ocorrer em temperaturas distintas e favoráveis para cada processo, 45-50 °C para hidrólise e cerca de 32-37 °C para fermentação (SZAMBELAN, *et al.*, 2018).

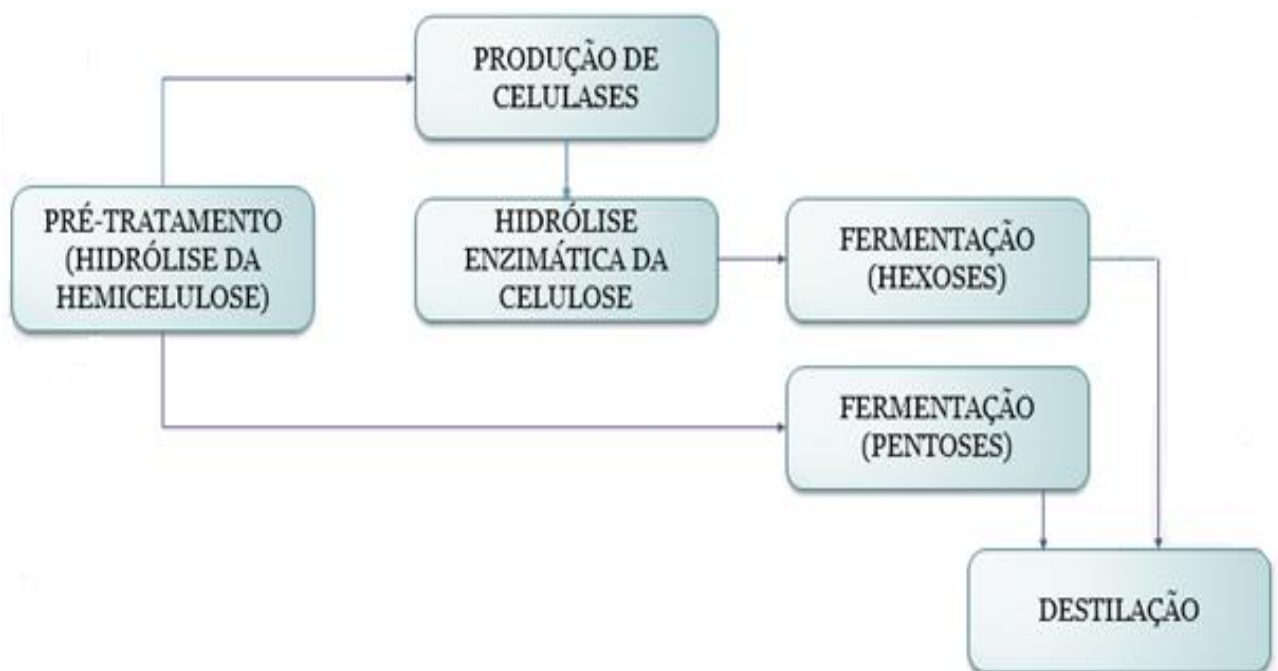


FIGURA 6 -Representação esquemática do processo de Fermentação e Hidrólise Separada (SHF).

3.8.2 Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF)

O processo sacarificação e fermentação simultânea apresenta as etapas de hidrólise enzimática de forma idêntica à descrição da SHF. Toda via, durante o processo de SSF a hidrólise enzimática e fermentação são realizadas em um único equipamento, assim, a glicose proveniente da ação de celulasas é convertida diretamente para etanol o que minimiza a os efeitos de inibição pelo produto (Figura 7).

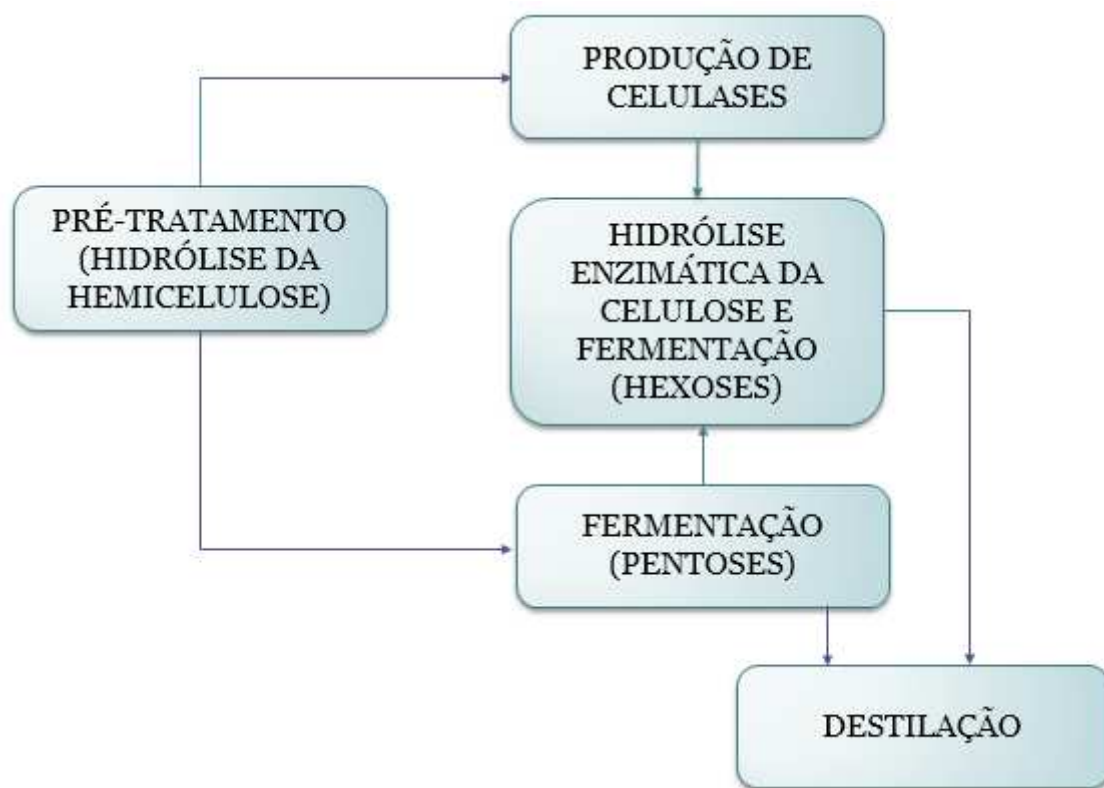


FIGURA 7 -Representação esquemática do processo de Fermentação e Hidrólise Simultânea (SSF).

3.9 *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são os micro-organismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. Trata-se de um organismo vivo, com múltiplas habilidades metabólicas, podendo alterar a estequiometria da fermentação em resposta a alterações no meio, com grande impacto no rendimento do processo (BARROS, 2014). Dentre as leveduras utilizadas em processos fermentativos, as cepas do gênero *Saccharomyces*, são normalmente a primeira escolha para produção de etanol industrialmente, devido à sua boa capacidade fermentativa, alta tolerância ao etanol e outros inibidores (formados tanto durante o pré-tratamento de matérias-primas

quanto durante a fermentação) e à capacidade de crescer rapidamente sob as condições anaeróbicas que são caracteristicamente estabelecidas durante a fermentação em larga-escala (REIS, *et al.*, 2017).

As características genéticas das cepas de leveduras e o processo de produção de etanol apresentam-se como fatores determinantes para aumento de rendimento e produtividade dos processos fermentativos, sendo também utilizados novos micro-organismos, adequações na composição e quantidade de nutrientes do meio na otimização do processo (LEE *et al.*, 2017).

S. cerevisiae é um fungo predominantemente unicelular de rápido crescimento e de fácil manipulação genética. Suas células podem ser esféricas, ovais ou elípticas, podendo ainda apresentar-se bastante alargadas (Figura 8). Suas dimensões variam consideravelmente em função da linhagem, nutrição, tempo de brotamento, entre outros fatores. Reproduzem-se sexuada e assexuadamente por brotamento, fissão ou cissiparidade, ou combinação desses dois mecanismos. Estes micro-organismos são hábeis para crescer e eficientes na produção de etanol em valores de pH de 3,5 a 6,0 e em temperaturas entre 28 e 35°C (TORTORA; 2016). Temperaturas inferiores retardam a fermentação e temperaturas superiores ocasionam a evaporação do álcool e o aparecimento de contaminações. Os valores de pH e temperatura podem afetar a fermentação, bem como, a linhagem e a concentração de levedura no meio (DONG *et al.*, 2017).

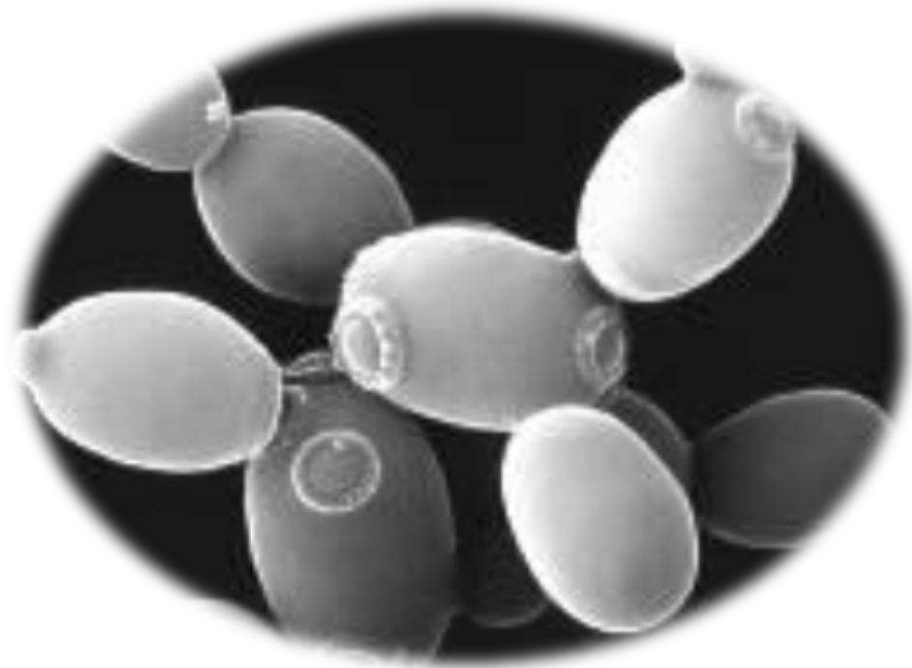


FIGURA 8 - Imagem microscópica das células de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.10 A biomassa Aguapé (*Eichhornia crassipes*)

O Aguapé (*Eichhornia crassipes*) é uma macrófita aquática emersa flutuante originária da região amazônica (Figura 9). A espécie prolifera rapidamente em lagos com elevadas concentrações de nutrientes (eutrofizados), utilizados em seu metabolismo, e tem a capacidade de remover metais pesados e outros contaminantes da água. As macrófitas aquáticas são plantas diversos grupos que se caracterizam por terem partes vegetativas que crescem ativamente, permanentemente ou por um período, submersas, flutuando ou sobre a superfície da água (PRIYA e SELVAN, 2017)

Estas plantas aquáticas apresentam taxonomia bastante diversificada, as classificações taxonômicas são definidas de acordo com a sua forma de vida ou tipo biológico/ecológico que está relacionada à sua forma de crescimento e fixação. As principais formas de vida são: macrófitas emersas, com folhas flutuantes, submersas enraizadas, submersas livres e flutuantes livres (ZHENG *et al.*, 2016).

Altas colonizações de Aguapé trazem impactos negativos na economia pesqueira, devido principalmente às baixas concentrações de oxigênio dissolvido na coluna d'água; favorecem a proliferação de insetos, larvas e moluscos transmissores de doenças como encefalite, malária e esquistossomose; influenciam a redução do fluxo de água em canais, represas e rios; dificultam a navegação e a pesca; e são responsáveis por elevadas perdas de água por evapotranspiração (de MELO *et al.*, 2016).

A baixa diversidade e densidade de inimigos naturais e a eutrofização do ambiente são as duas principais causas do excessivo crescimento de plantas aquáticas (ZHENG *et al.*, 2016). Nessas condições, há necessidade do controle populacional dessas plantas para manter as colonizações dentro de limites em que seus efeitos benéficos ao ambiente aquático suplantem os efeitos prejudiciais. Esse controle pode ser feito pelo aumento de pressão de inimigos naturais (controle biológico) ou pela promoção da morte (controle químico) ou retirada das plantas do corpo hídrico (controle mecânico) (THI *et al.*, 2017).

O crescimento da *Eichhornia crassipes* é intenso, o que pode acarretar na cobertura total do leito de um rio, isto implica diretamente em prejuízos para a flora, fauna e na produção de energia, pois o acúmulo das plantas atrapalha o funcionamento das turbinas nas usinas hidrelétricas. Por causar todos esses problemas ambientais e econômicos, o Aguapé é considerado uma praga aquática (GANGULY; CHATTERJEE; DEY, 2012; DAS *et al.*, 2016). Diante de todos esses fatores é necessária a retirada, em uma quantidade eficiente, do Aguapé

dos corpos hídricos. A sua biomassa pode ser utilizada para diversas finalidades como compostagem e fertilização de solos, alimento para animais, além de fonte de energia, na forma de briquetes, ou na produção de biocombustíveis (REZANIA *et al.*, 2015). No setor de biocombustível, essa biomassa pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração (BAYRAKCI; KOÇAR, 2014; DAS *et al.*, 2015; PATEL; PATEL, 2015; DAS *et al.*, 2016).



FIGURA 9 – Planta macrófita Aguapé (*Eichhornia crassipes*) presentes no reservatório da Usina Hidrelétrica de Buaguarí-MG. Fonte: Próprio autor

3.11 A biomassa de Aguapé como fonte de produção de etanol de 2ª geração

A Aguapé pode ser aplicada como uma fonte útil de biomassa devido ao seu rápido crescimento e expansão. O desenvolvimento desta macrófita ocorre principalmente em águas ricas em nutrientes, e apresentam grande resistência a diferentes variações nos níveis de nutrientes, temperatura e pH. Entretanto, sua aglomeração se propaga como tapetes densos dificultando a passagem de luz para as plantas submersas e reduzindo os níveis de oxigênio na água, o que traduz em um importante problema ambiental (CHENG *et al.*, 2015). Diante destes fatores, a Aguapé pode ser uma promissora fonte de biomassa para a produção de biocombustíveis devido aos vários aspectos positivos como: 1) não compete com recursos utilizados na cultura alimentar; 2) não causa mudanças no uso do solo ou no agrossistema para a produção de biocombustível; 3) o baixo custo econômico; 4) os potenciais benefícios para o ecossistema durante o período de extração (BERGIER *et al.*, 2012).

A sua taxa de crescimento tem um valor muito elevado, 220 kg/ha/dia (BAYRAKCI; KOÇAR, 2014). Essa rápida taxa de crescimento, junto com a capacidade de competir com

outras plantas aquáticas e sua facilidade de adaptação tornam o Aguapé uma das plantas mais invasivas, pois, atualmente, é possível encontrar essa planta nos cinco continentes. Essas características proporcionam a esse vegetal, capacidade de gerar quantidade significativa de biomassa que pode estender-se em grande extensão na superfície de um corpo hídrico, causando muitos problemas ambientais e econômicos (TÉLLEZ *et al.*, 2008; PATEL; PATEL, 2015). Tais características conferem entre as espécies de macrófitas aquáticas, a *E. crassipes* como uma das alternativas mais promissoras para a utilização industrial.

Um dos fatores mais importantes para a utilização de uma determinada matéria-prima na produção de biocombustíveis é a sua composição química. O Aguapé apresenta um significativo teor de água em comparação com a sua matéria seca, esse valor é superior a 90%. A caracterização química da sua biomassa seca é composta por aproximadamente de 25% de celulose, 35% de hemicelulose, 10% de lignina, 25% de cinzas. O valor das cinzas é alto por causa da propriedade desta planta de retirar substâncias dos corpos hídricos como os metais pesados (GANGULY; CHATTERJEE; DEY, 2012; REZANIA *et al.*, 2015; GAO *et al.*, 2016).

Os altos teores de celulose e hemicelulose permitem obter maiores concentrações de açúcares fermentescíveis que poderão ser convertidos a etanol por ação microbiológica. Portanto, devido ao seu rápido crescimento e baixo teor de lignina a Aguapé pode ser considerada como fonte promissora de biomassa para conversão de açúcares fermentescíveis em etanol.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coletas da amostra de Aguapé *Eichhornia crassipes*

As amostras de Aguapé foram coletadas no reservatório da Usina Hidrelétrica de Baguari, localizada no leito do Rio Doce, no município de Governador Valadares-MG (19° 01'04.34"S; 42° 07'22.36"O; Elev 179m). Após a coleta as mesmas foram trituradas em picadeira elétrica (John Deere-7350) para a uniformização das partículas em tamanho médio de 0,5 centímetros. Em seguida o material foi submetido a secagem em estufa a 60°C durante 48 horas até a obtenção de peso constante. Posteriormente, a amostra seca foi submetida a moagem em moinho tipo martelo (Quimis-340) com o objetivo de aumentar a superfície de contato a fim de melhorar a eficiência dos testes analíticos.

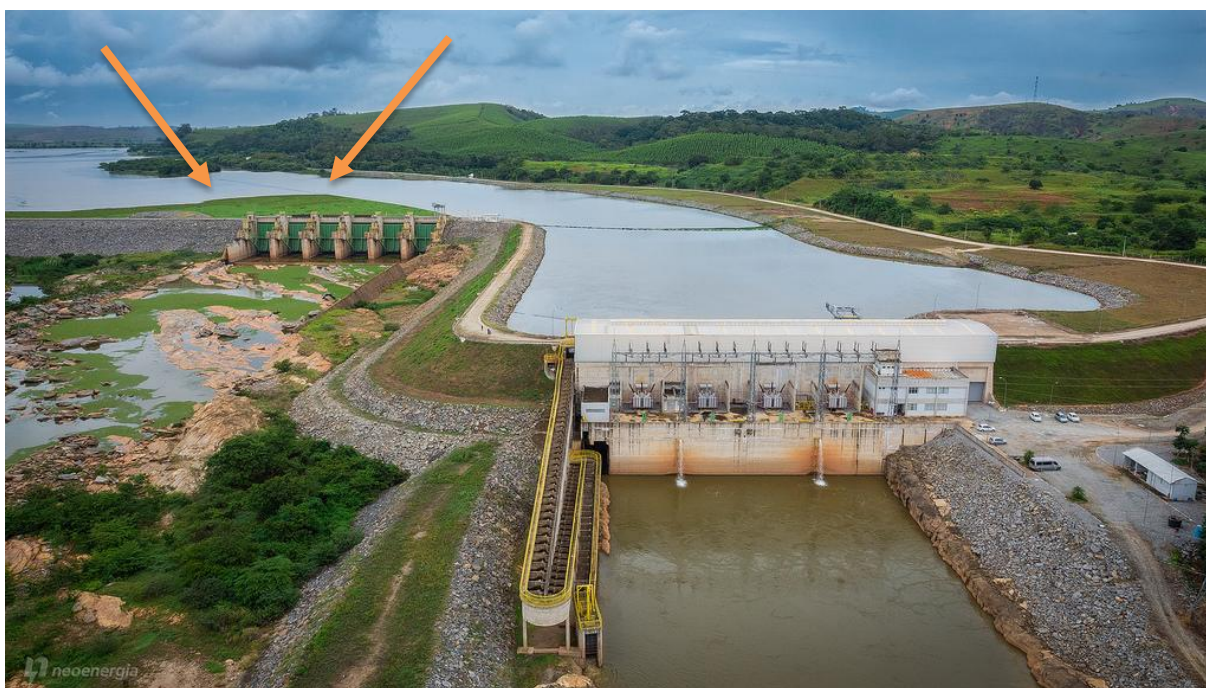


FIGURA 10 - Imagem aérea da Usina Hidrelétrica de Baguari, Gov. Valadares - MG, local da coleta das plantas de Aguapé (*Eichhornia crassipes*). Fonte: Consórcio UHE Baguari (2018).

4.2. Caracterização química da amostra de Aguapé

As amostras coletadas foram submetidas aos ensaios analíticos conforme descrito a seguir na Figura 11

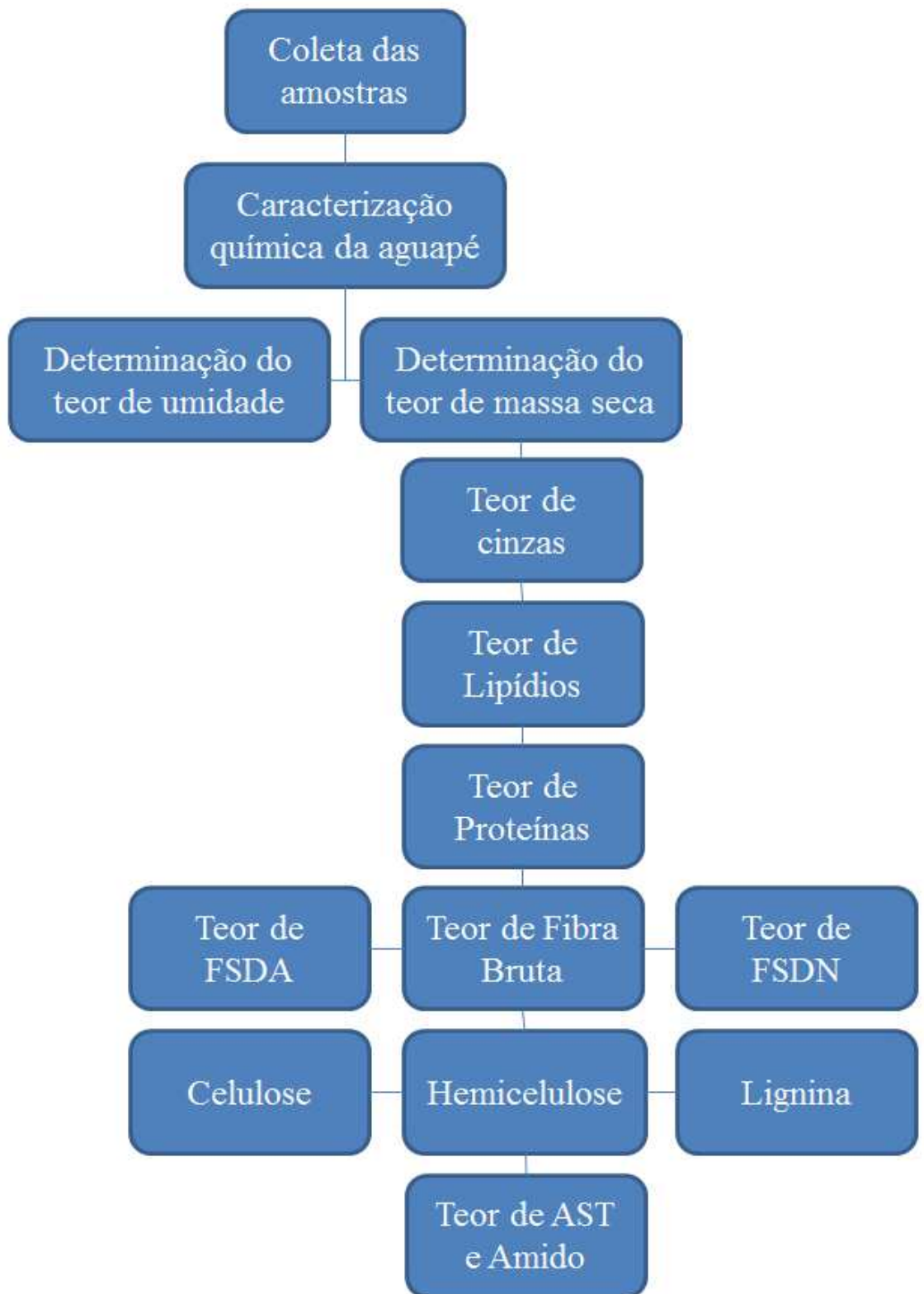


FIGURA 11–Fluxograma das etapas de coleta e caracterização química da Aguapé (*Eichhornia crassipes*). Fonte: Autor

4.2.1 Determinação do teor de umidade da amostra íntegra

O teor de umidade da amostra íntegra de Aguapé foi determinado de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). A análise foi realizada a partir de 3,0g (triplicata) de amostra fresca contidas em placas de vidro previamente desumidificada e com peso conhecido. As placas contendo a amostra foram submetidas à desidratação em estufa a 105°C até peso constante. O resultado foi calculado segundo a fórmula abaixo e expresso em porcentagem de umidade.

$$U = \frac{(P_{mi} - P_{mf})}{m_i} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

U = teor de umidade em porcentagem

P_{mi} = massa (g) da placa de vidro com amostra íntegra

P_{mf} = massa (g) da placa de vidro com amostra seca (desidratada)

4.3 Determinação do teor de matéria seca

A partir da amostra de Aguapé previamente desidratada foi avaliado o teor de matéria seca. Para tanto procedeu-se a pesagem de 3,0g de amostra provenientes da descrição do item 4.2.1 (triplicata) em placa de vidro previamente desumidificada e com peso conhecido, seguida de desidratação a 105°C até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de umidade a partir da fórmula descrita na equação 2.

$$MS = \frac{(P_{mi} - P_{mf})}{m_i} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

MS = teor de matéria seca em porcentagem

P_{mi} = massa (g) da placa de vidro com amostra seca

P_{mf} = massa (g) da placa de vidro com amostra seca (desidratada)

4.4 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado a partir de 0,5g de amostra (triplicata) contida em cadinho de porcelana, previamente calcinado em mufla a 550°C e com peso conhecido. As

amostras foram previamente carbonizadas e em seguida incineradas em mufla a 550°C. Após completa incineração, os cadinhos contendo as amostras foram resfriados em dessecador e pesados. Os resultados foram expressos em g/100g de matéria integral. A determinação foi feita segundo a equação 3 (IAL, 2008).

$$C = \frac{(M - P) \times 100}{A} \quad \text{Equação 3}$$

C= teor de cinzas em porcentagem
M= massa do cadinho com cinzas, em gramas
P= massa do cadinho vazio, em gramas
A= massa da amostra, em gramas

4.5 Determinação do teor de lipídeos

A quantificação do teor de lipídeos foi realizada a partir de 1,0g de amostra (triplicata) contidas em cartuchos de papel de filtro qualitativo com porosidade de 12,5µm. Em seguida os cartuchos contendo a amostra foram colocados em aparelho extrator Soxhlet, para extração dos lipídeos com éter etílico por aproximadamente 8 horas. Os lipídeos foram coletados em balões de fundo chato de 250 mL, previamente aquecidos a 105°C e resfriados até temperatura ambiente em dessecador e pesados. Após a extração, os balões foram mantidos em estufa a 105°C por aproximadamente uma hora para evaporação do solvente remanescente no óleo e em seguida, resfriados em dessecador até temperatura ambiente e pesados (IAL, 2008). Os resultados foram expressos em g100g⁻¹ de amostra integral e determinado segundo a fórmula abaixo.

$$L = \frac{(M - P) \times 100}{A} \quad \text{Equação 4}$$

L= teor de lipídeo em porcentagem
M= massa do balão com lipídio, em gramas
P= massa do balão vazio, em gramas
A= massa da amostra em gramas contida no cartucho de papel

4.6 Determinação do teor de proteína

O teor de proteína foi quantificado segundo o método Kjeldal (IAL, 2008), adicionando-se 0,5g de amostra de Aguapé (em triplicata) desidratada e triturada, com 600mg de sulfato de potássio, 10mL de ácido sulfúrico concentrado e 300mg de sulfato de cobre em um tubo de

ensaio, o tubo foi inserido em bloco digestor a 350°C, até o material contido no tubo ficar límpido. Em seguida, foi inserido 15mL de solução de hidróxido de sódio 50% aos tubos. Após esta etapa o recipiente foi disponibilizado em um destilador de nitrogênio (marca, Tecnal®). O material destilado foi recuperado em frasco cônico de 250mL, contendo 15mL de solução saturada de ácido bórico e 3 gotas de solução indicadora (vermelho de metila 0,1%). Em seguida o material foi titulado com ácido clorídrico 0,02N. Os resultados foram calculados conforme a equação e expressos em g 100g⁻¹ de material integral.

$$\text{Prot (\%)} = \frac{(V(\text{HCl}) \times N(\text{HCl}) \times 14 \times 6,25)}{\text{Peso da amostra (mg)}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

4.7 Determinação do teor de fibra bruta

O teor de fibra bruta foi determinado a partir de 0,5g de massa seca (em triplicata) contido em um tubo de ensaio, seguido da adição de 17,5 mL de ácido acético a 70% e 0,5 g de ácido tricloroacético (KAMER e GINKEL 1952). A mistura contida no tubo (amostra) foi submetida a digestão em bloco digestor a 110°C por 30 min. Posteriormente, o material foi filtrado usando filtros sinterizados previamente desumificados e pesados, contendo lã de vidro. A filtração foi conduzida realizando-se sucessivas lavagens da amostra com água destilada quente (65°C) até retirada total da acidez (pH neutro). Os filtros sinterizados contendo amostra foram submetidos a secagem em estufa a 105°C até peso constante. Os resultados foram expressos em g 100g⁻¹ de fibra integral e cálculo de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{FB\%} = \frac{(FSi - FSv)}{A} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

FB= teor de fibra bruta em porcentagem

FSi= massa do filtro sinterizado com resíduo de fibra após lavado e seco

FSv= massa do filtro sinterizado vazio

A= massa da amostra em gramas

4.8 Determinação do teor de fibra solúvel em detergente ácido (FSDA)

A determinação do teor de FSDA ocorreu mediante pesagem de 0,25 g de amostra, adicionados a um e transferidos para tubo de ensaio, juntamente com 25 mL de solução de detergente ácido (27,7 mL de H₂SO₄ (95 a 98%) reagente para 972,3 mL de água; 20g brometo de cetil trimetilamônio-CTAB (CH₃(CH₂)₁₅N(CH₃)₃Br); Amônia ((CH₃)₂CO). As amostras

contidas nos tubos foram digeridas em bloco digestor (marca, Tecnal®) por 30 minutos a 110°C. Em seguida o material foi filtrado em filtros sinterizados, previamente desumidificados em estufas a 105°C e com peso conhecido. As amostras foram lavadas com água destilada quente (65°C) e posteriormente com acetona para retirada total do detergente. Em seguida os filtros sinterizados contendo as amostras foram secos em estufa a 105°C até peso constante (VANSOEST, 1970). O teor de fibras solúveis em detergente ácido foi expresso em % de FSDA/g de amostra íntegra através da fórmula abaixo:

$$\text{FSDA}\% = \frac{(F_{ls} - F_v)}{A} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

FSDA% = teor de fibra bruta em porcentagem

F_{ls} = massa do filtro sinterizado com resíduo de fibra após lavado e seco, em gramas

F_v = massa do filtro sinterizado vazio, em gramas

A = massa da amostra, em gramas

4.9 Determinação do teor de fibra solúvel em detergente neutro (FSDN)

A quantificação da FSDN foi realizada partir de 0,25g de amostra como descrita no item 4.2.1 contidas em tubo de ensaio, juntamente com 25mL de solução de detergente neutro (Lauril sulfato de sódio $C_{12}H_{25}NaO_4S$; 30g, EDTA etilenodiaminotetracético sal dissódico $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ 6,81g; borato de sódio decahidratado $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 122,58g, fosfato de sódio dibásico anidro Na_2HPO_4 82,08g; trietilenoglicol 180 mL; sulfito de sódio anidro Na_2SO_3 ; acetona $((CH_3)_2CO)$; solução de alfa-amilase termo-estável A3306 Sigma®) submetidas a digestão em bloco digestor por 30 minutos a 110°C. Em seguida o material foi filtrado em filtros sintetizados, previamente desumidificados em estufa a 105°C e com peso conhecido. As amostras foram lavadas com água destilada quente (95°C) e posteriormente com acetona para retirada total do detergente. Em seguida, os filtros sinterizados contendo a amostra foram submetidos a secagem em estufa a 105°C até peso constante (VANSOEST, 1970). O teor de fibras solúveis em detergente neutro foi expresso em % de FSDN/g de amostra íntegra, usando a fórmula a seguir:

$$\text{FSDN}\% = \frac{(F_{ls} - F_v)}{A} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

FSDN% = teor de fibra bruta em porcentagem

F_{ls} = massa do filtro sinterizado com resíduo de fibra após lavado e seco, em gramas

F_v = massa do filtro sinterizado vazio, em gramas

A= massa da amostra em gramas

4.10 Determinação do teor de celulose

A quantificação do teor de celulose foi determinada a partir das amostras residuais contidas nos filtros sinterizados, proveniente da análise de FSDA. As amostras contidas em filtros sinterizados foram submetidas à secagem até peso constante e em seguida foram adicionadas de 30mL de ácido sulfúrico a 72% (p/p) e submetidas a filtração à vácuo. Após o escoamento completo do ácido, os filtros foram lavados com água destilada fervente (95°C), por três vezes. Em seguida estas foram submetidas a secagem em estufa a 105°C, até peso constante, logo após foram resfriadas em dessecador e pesadas. A massa de celulose foi dada pela diferença da massa do filtro sinterizado antes e depois da adição da solução de ácido sulfúrico a 72% (VANSOEST, 1970). O resultado foi calculado de acordo com a fórmula descrita a seguir e expresso em porcentagem de massa integral.

$$\text{CEL}\% = \frac{(F(\text{antes}) - F(\text{depois}))}{A} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

CEL% = teor de celulose

$F(\text{antes})$ = massa do filtro sinterizado com resíduo depois de lavado e seco, antes da adição do ácido sulfúrico (g)

$F(\text{depois})$ = massa do filtro sinterizado com resíduo depois da adição do ácido sulfúrico (g) A= massa da amostra em gramas

A= massa da amostra, em gramas

4.11 Determinação do teor de lignina

O teor de lignina foi determinado a partir das amostras remanescentes da análise de celulose após incineração em mufla a 550°C. Posteriormente os filtros foram resfriados em dessecador até temperatura ambiente (25°C) e submetido a pesagem. O teor de lignina foi calculado pela diferença entre a massa do filtro sinterizado antes e após incineração (VANSOEST, 1970). Os resultados foram obtidos de acordo com a fórmula descrita abaixo:

$$\text{LIG}\% = \frac{(F(\text{antes}) - F(\text{mufla}))}{A} \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

LIG% = teor de lignina

$F(\text{antes})$ = massa do filtro sinterizado contendo resíduo lavado e seco depois da adição do ácido sulfúrico (g)

$F(\text{mufla})$ = massa do filtro sinterizado contendo resíduo depois de incinerados em mufla (g)
 A= massa da amostra em gramas

4.12 Determinação do teor de hemicelulose

O teor de hemicelulose foi quantificado pela diferença entre as massas das amostras remanescentes provenientes das análises de FSDN e FSDA (VAN SOEST, 1970). Os resultados foram calculados de acordo com a fórmula abaixo e expresso em porcentagem de massa integral.

$$\text{HEM}\% = \frac{(\text{FSDAm}) - (\text{FSDNm})}{A} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

HEM% = teor de hemicelulose, em porcentagem

FSDAm = massa da amostra remanescente da análise de FSDA (g)

FSDNm = massa da amostra remanescente da análise de FSDN (g)

A= massa da amostra, em gramas

4.13 Determinação do teor de açúcares solúveis totais (AST) e amido

a) Preparo da amostra

Os teores de amido e açúcares totais foram determinados segundo a metodologia descrita por McCready (1950). Para tanto, procedeu-se a adição de 0,2g de amostra em tubo tipo Falcon de 10 mL, seguida da adição de 10 mL de álcool 80%. Em seguida, as amostras foram submetidas a centrifugação a 11.500G sendo o processo repetido por três vezes. A fração sobrenadante foi coletada e avolumada para 50 mL em balão volumétrico, para posterior quantificação de açúcares solúveis totais (AST) e a partir do precipitado foi realizada a quantificação do teor de amido. O precipitado foi adicionado de 11,5mL de ácido perclórico 30%, seguido de agitação em agitador tipo vortex por dois minutos. Em seguida, a reação foi deixada em repouso por 30 minutos, com agitação ocasional e então, centrifugada a 11.500G por 10 minutos. Após a centrifugação o material foi ressuspensão e o procedimento foi repetido por três vezes. O sobrenadante foi coletado e avolumado em balão volumétrico de 50mL para posterior quantificação do teor de amido. As análises foram realizadas em triplicata.

b) Quantificação do teor de amido e açúcares solúveis totais (AST)

As quantificações dos teores de amido e AST foram realizadas com solução de antrona 0,1% em ácido sulfúrico, utilizando curva analítica de D-glicose como referência nas concentrações de 0 a 0,1 mg/mL (Figura 11). A quantificação foi realizada a partir de 1 mL do sobrenadante avolumado, conforme descrito acima, contido em tubo de ensaio de 10 mL adicionado de 5mL da solução de antrona, seguidos de 12 minutos de incubação em banho de água fervente ($95\pm 1^\circ\text{C}$) e resfriamento em banho de água com gelo. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Bel Photonics® 1105) a 620nm (MCCREADY, 1950). Os resultados foram expressos em porcentagem de amido e AST em massa integral.

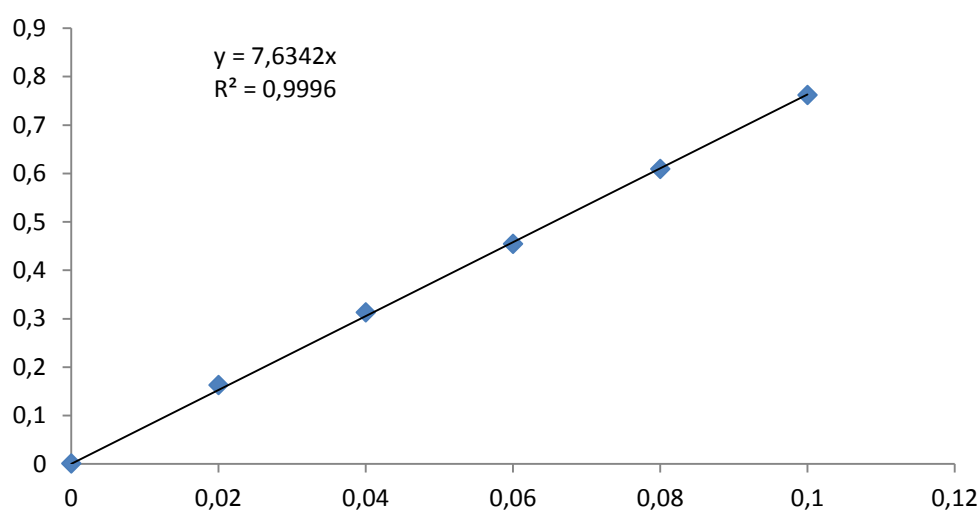


FIGURA 12 Representação gráfica das curvas analíticas para o ensaio de dosagem de Amido e AST, segundo método descrito por McCready (1950).

4.14 Determinação de açúcares redutores (AR)

Os teores de açúcares (AR) foram determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). A quantificação foi realizada em microtubo tipo Eppendorf de 2 mL, pela adição de 100 μL da amostra (centrifugada) e 100 μL do reagente DNS, seguidos de incubação a 100°C por 5 min e adição de 1,0 mL de água. Após homogeneização procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Uma curva analítica foi preparada utilizando D-glicose como referência nas concentrações de 0 a 0,1 mg/mL, sendo esta preparada de acordo com o procedimento empregado para amostra. Os resultados foram expressos em porcentagem de AR em massa integral.

4.15 Obtenção do hidrolisado

As atividades experimentais em laboratório para obtenção do hidrolisado a partir da massa seca de Aguapé e posterior produção de etanol ocorreram através das seguintes etapas:



FIGURA 13–Fluxograma das etapas de obtenção do hidrolisado e produção de etanol de segunda geração a partir da Aguapé (*Eichhornia crassipes*). Fonte: Autor

4.16 Pré –tratamento ácido

O pré-tratamento ácido foi realizado a partir de 100 g da massa seca de Aguapé como descrita no item 4.2.1 contida em Erlenmeyer de 500 mL, adicionada de solução de H_2SO_4

7% (v/v) com razão sólido/líquido de 20%, seguida de hidrólise em autoclave a 1 atm (120°C) por 30 minutos.

4.17 Pré-tratamento alcalino

A realização do processo de pré-tratamento alcalino, foi utilizado 100 g da massa seca de Aguapé obtida após pré-tratamento ácido H_2SO_4 à 7% (v/v) em razão sólido/líquido de 20% à temperatura de 120°C (autoclave) por 1 hora. A massa seca de Aguapé obtida da otimização do pré-tratamento ácido foi tratada com solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 12% (m/v) em razão sólido/líquido de 10% à temperatura de 80 °C (banho-maria) por 36 horas.

Após o pré-tratamento alcalino foram realizados os ensaios para a determinação açúcares redutores presentes no hidrolisado. O resíduo sólido oriundo do processo de filtração do pré-tratamento foi lavado com água destilada sob vácuo até atingir pH neutro, e em seguida submetido a secagem em estufa com circulação de ar forçada a 60°C por 24 horas. As amostras do resíduo já desidratado foram reservadas para as análises de celulose, hemicelulose e lignina (Figura14).



FIGURA 14- Aspecto da Biomassa de Aguapé in natura, após tratamento ácido e após tratamento ácido seguido de tratamento básico.

4.18 Otimização do processo de pré-tratamento ácido

O processo de pré-tratamento ácido foi realizado empregando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), incluindo seis pontos axiais e 4 pontos centrais, totalizando 18 ensaios. As variáveis independentes avaliadas sobre a eficiência da hidrólise ácida na fração hemicelulósica da massa seca de Aguapé e otimização das condições

hidrolíticas foram: tempo, razão sólido líquido (S/L) e concentração de ácido sulfúrico (H_2SO_4) sobre a porcentagem de conversão AR. A partir das condições definidas no planejamento foi pesado 0,5g de massa seca de Aguapé, em tubos de ensaio, tipo pirex (30 cm x 2,5 cm), seguido da adição de ácido sulfúrico e autoclavado a 1 atm (120°C) por tempo variado, conforme condição descrita no planejamento apresentados na Tabela 1. O planejamento e análise dos resultados foi realizado utilizando-se o programa STATISTICA Versão 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa®). A qualidade do ajuste da equação do modelo foi expressa pelo coeficiente de determinação (R^2) e sua significância estatística condicionada pelo teste-F. Os efeitos dos fatores avaliados foram mensurados pela análise do diagrama de Pareto e pelas curvas de superfície de resposta, com suas correlações e curvaturas.

TABELA 1- Delineamento Composto Central Rotacional com dois níveis, 3 fatores (concentração de H_2SO_4 , razão sólido líquido e tempo em minutos), 6 pontos axiais e 4 pontos centrais (15C, 16C, 17C, 18C), autoclavados a 1 atm a 120 °C.

Amostra	Pré-tratamento ácido Ácido Sulfúrico (%) (v/v)	Razão (S/L) (%)	Tempo (minutos)
1	2,00	10,00	15,00
2	2,00	10,00	55,00
3	2,00	30,00	15,00
4	2,00	30,00	55,00
5	8,00	10,00	15,00
6	8,00	10,00	55,00
7	8,00	30,00	15,00
8	8,00	30,00	55,00
9	0,75	20,00	35,00
10	9,24	20,00	35,00
11	5,00	5,85	35,00
12	5,00	34,14	35,00
13	5,00	20,00	6,71
14	5,00	20,00	63,28
15C	5,00	20,00	35,00
16C	5,00	20,00	35,00
17C	5,00	20,00	35,00
18C	5,00	20,00	35,00

(S/L) Razão Sólido Líquido

4.19 Difração de Raio-X (DRX)

A análise de difração de raios-X (DRX) permite determinar o grau de cristalinidade do material lignocelulósico e a eficiência dos tratamentos na remoção da lignina por meio da análise do perfil do difratograma. Os índices de cristalinidade (IC) da massa seca de Aguapé e após pré-tratamento foram calculados conforme a equação de Buschle-DillerZeronian que permite calcular o grau de cristalinidade das amostras. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de cristalinidade presente nas fibras da massa seca de Aguapé.

$$IC = \left(1 - \frac{I_1}{I_2}\right) * 100 \quad \text{Equação 12}$$

Onde: I_1 é a mínima intensidade referente ao material amorfo e I_2 é a máxima intensidade referente ao pico de cristalinidade de gráfico. As análises foram realizadas em um difratômetro Rigaku Ultima IV, com o raio-X sendo gerado em um tubo de cobre ($\text{CuK}\alpha_1$) com uma voltagem de 40kV e uma corrente de 30mA, e com o comprimento de onda de $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$.

4.20 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

No intuito de observar e avaliar o efeito do pré-tratamento ácido sobre a superfície das fibras da massa seca de Aguapé foi utilizada a técnica de MEV. Foi submetido a pesagem 1g de massa seca de Aguapé, posteriormente, acondicionou a amostra em uma placa de metal e cobriu-se com uma camada de 30 nm de ouro usando um modelo JFC-1500 (JEOL Co. Ltd.) em um ambiente com gás argônio. As amostras foram, então, examinadas com um microscópio eletrônico de varredura (modelo Quanta 200, FEI Company). Foram examinadas múltiplas micrografias de cada amostra (massa seca de Aguapé não tratada e após pré-tratamento ácido) em diferentes ampliações. O equipamento foi ajustado para uma tensão de aceleração do feixe de elétrons de 20 Kv. As imagens foram realizadas no Laboratório de Processos Químicos da UFVJM.

4.21 Seleção da melhor condição de pré-tratamento ácido

A seleção da melhor condição de pré-tratamento ácido foi feita a partir do planejamento DCCR. Após o pré-tratamento ácido o hidrolisado foi filtrado a vácuo, e retiradas alíquotas para determinação das análises de AR. O resíduo sólido oriundo do processo de filtração do pré-tratamento foi lavado com água destilada sob vácuo até atingir pH neutro, e em seguida submetido a secagem em estufa com circulação de ar forçada a 60°C por 24 horas. As amostras do resíduo já desidratado foram reservadas para as análises de celulose, hemicelulose e lignina.

4.22 Sacarificação enzimática

A determinação das melhores condições de sacarificação enzimática ocorre através de experimentos considerando os parâmetros: razão sólido-líquido (S/L), tempo e concentração de enzimas. Utilizou-se Erlenmeyers de 50 ml com a adição da massa seca de Aguapé previamente moída. Para tanto foi construído um planejamento fatorial, incluindo seis pontos axiais (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 horas) e 2 pontos centrais (Biomassa total e Concentração celulose em Biomassa), totalizando 12 ensaios.

No processo de sacarificação, foi utilizado o preparado enzimático da enzima comercial Celuclast® (Novozymes®) na concentração de 7 FPU/grama de biomassa e a atividade enzimática foi determinada por espectrofotometria à 540 nm (Gomez, *et al.*, 2010; Frydendal-Nielsen, *et al.*, 2017). No intuito de estabelecer parâmetros comparativos foi preparada uma curva analítica de glicose como referência nas concentrações de 0 a 1 mg/mL, sendo 1 U (unidade de atividade) a quantidade de enzima que catalisa um micromol de produto por minuto (GHOSE, 1987).

O processo de sacarificação enzimática utilizou 0,5 g de biomassa seca pré-tratada, seguida da adição de 10 ml da solução tampão de acetato de sódio 50 mM (pH 5) perfazendo 20% da razão (S/L). Posteriormente iniciou-se a homogeneização e adição da enzima em quantidades específicas determinada no planejamento experimental (DCCR) demonstrado na Tabela 1. A sacarificação foi conduzida em estufa incubadora (marca Nova Ética) sob agitação de 36 G, a temperatura de 50°C por 30 minutos. Foram avaliados processos de sacarificação com 4 pontos em um período total de 16 horas. Alíquotas do filtrado (hidrolisado) foram coletadas em triplicata, e analisadas quanto aos teores de AR a fim de verificar os açúcares liberados. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de AR sobre massa integral.

4.23 Processo fermentativo

Os processos fermentativos foram conduzidos utilizando o hidrolisado proveniente da sacarificação enzimática como meio fermentativo. Foram utilizadas duas metodologias distintas para o processo de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica: simultânea e separada. Em ambos os processos, foi utilizado a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (marca Fleischmann®), na forma desidratada normalmente comercializada como fermento biológico seco e instantâneo. Para o início do processo fermentativo procedeu-se o inoculação da levedura na proporção de 2 % do meio, seguido de incubação a temperatura de 28°C sob agitação constante de 36 G.

O processo fermentativo foi monitorado por 25 horas em fermentômetro (Figura 15), que consiste em um sistema composto por um tubo Falcon® cônico (50 mL) acoplado a um dispositivo que permite o desprendimento de CO₂ e que impede a entrada de O₂. Este sistema possibilita acompanhar o processo fermentativo, por meio de sucessivas pesagens, em intervalos de tempos regulares até peso constante. A massa de CO₂ desprendida é utilizada para estimar o etanol produzido e conseqüentemente a concentração de açúcares fermentescíveis existente na biomassa (PANTOJA, 2006). A pesagem do sistema foi realizada a cada uma hora e os valores obtidos pela perda de massa (CO₂) do sistema foram utilizados para determinar o fim da fermentação. A fermentação foi estabelecida em 25 horas devido ao perfil de crescimento da levedura, evitando-se a fase de declínio do microrganismo (DONG, *et al*, 2015).

No início e final do processo fermentativo alíquotas de 2 mL foram retiradas para posterior análise de açúcares redutores (AR) acordo com o item 4.14, e 2 mL ao final do processo para avaliar o teor de etanol através de destilação (item 4.22).

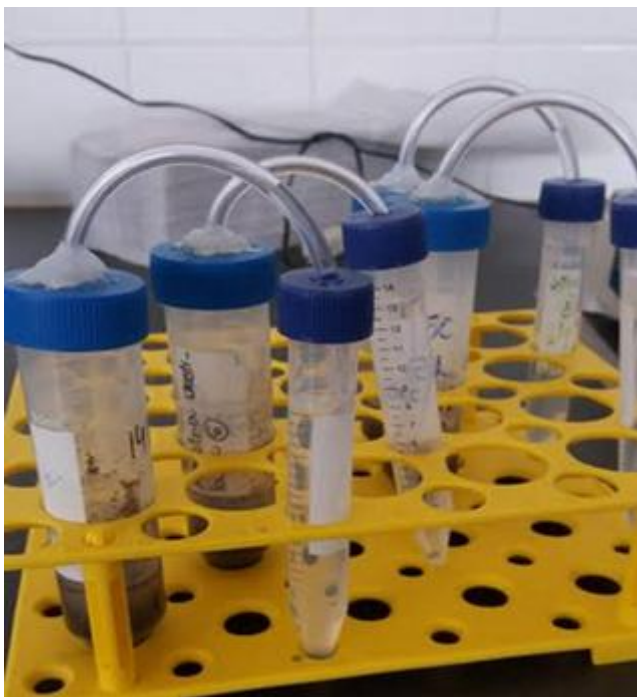


FIGURA 15- Fermentômetro utilizado para condução do processo fermentativo o qual permite a saída do CO₂ sem permitir a entrada de ar (sistema *air lock*).

4.23.1. Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF)

O processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) utilizou a enzima comercial Cellic CTec2® da Novozymes® na condição de 7 FPU/g de massa seca. Foi submetida a pesagem 1,5g de massa seca de Aguapé após pré-tratamento ácido otimizado e acondicionou a amostra em tubos Falcon® de 50 mL acoplados com sistema *air lock* (fermentômetro), na razão sólido/líquido de 20% em solução tampão de pH 4,8. O processo de hidrólise foi iniciado após pesagem inicial dos fermentômetros e posteriormente submetidos à agitação constante em Shaker Ethiktechnology® por 36 G por 50°C. Os processos de fermentação alcoólica utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, da marca Fleischmann®, com o nome comercial de fermento biológico seco e instantâneo. A levedura foi inoculada após 2 horas de hidrólise na concentração de 2% do volume total do hidrolisado. O fermentômetro após o inóculo da levedura foi submetido a agitação orbital de 36 G à temperatura de 28 °C por 25 horas. Durante o processo de fermentação o sistema fermentômetro foi pesado a cada uma hora e os valores obtidos pela perda de massa (CO₂) do sistema foram utilizados para determinar o fim da fermentação. O desprendimento de CO₂ foi acompanhado por meio de sucessivas pesagens do sistema fermentômetro no intervalo de 25 horas. As pesagens foram realizadas em intervalos de 30 minutos nas primeiras 2 horas, posteriormente, intervalos de 1 hora até 6 horas de fermentação, 2 horas até 25 horas finalizando o processo. Os valores de CO₂ obtidos ao longo

do tempo foram utilizados para estimar o perfil de produção do etanol segundo a estequiometria do processo fermentativo, na qual para cada 0,499g de CO₂ liberados é produzido 0,511g de etanol (KOSARIK; VARDAR-SUKAN, 2001).

4.23.2. Sacarificação e Fermentação Separada (SHF)

Os processos de hidrólise enzimática e fermentação separada apresentaram condições idênticas à hidrólise e fermentação simultânea. Utilizou-se a enzima comercial Cellic CTec2® da Novozymes® na condição de 7 FPU/g em 1,5g de massa seca de Aguapé, a razão sólido/líquido foi de 20% em solução tampão de pH 4,8. O processo de hidrólise foi iniciado após pesagem dos fermentômetro e submetido agitação constante em Shaker Ethiktechnology® à 36 G na temperatura de 50°C. O processo de fermentação alcoólica utilizou a mesma levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e o inóculo ocorreu após 16 horas de hidrólise na concentração de 2% do volume total do hidrolisado. O fermentômetro após o inóculo da levedura foi submetido a agitação orbital de 36 G à temperatura de 28 °C por 25 horas e o monitoramento do desprendimento de (CO₂) obedeceu os mesmos critérios da (SHF).

Ao final dos processos de SSF e SSH alíquotas foram coletadas e analisadas quanto aos teores de etanol, açúcares redutores (MILLER, 1959) e glicose (LLOYD; WHELAN, 1969). Para determinação do teor de etanol, as amostras foram pré-destiladas e posteriormente quantificadas segundo método descrito por Pilone (1985). Valores de eficiência hidrolítica final (*Ef*) foram calculados conforme equação 13.

$$E_f = \frac{((Etanol\ g/100g) \times 2) + AR_{fin}\ (g/100g)}{Polissacarídeos\ (g/100g)} \quad \text{Equação 13}$$

Ef: Eficiência hidrolítica final

Etanol (g/100g): Quantidade de etanol (g) no final do processo de SSF referente a 100g de massa seca de Aguapé.

AR_{fin}: Quantidade de açúcares redutores (g) no final do processo de SSF referente a 100g de massa seca de Aguapé.

Polissacarídeos: Quantidade de amido, celulose e hemicelulose (g) presentes em 100g de massa seca de Aguapé.

4.24 Determinação do teor de etanol

A determinação do teor de etanol (EtOH) no meio de fermentação foi realizada no final do processo. Para isso foram coletados 2 mL do meio fermentado, o qual foi submetido à destilação em microdestilador de álcool (TEC132/TECNAL), recolhendo um volume final de 20 mL de destilado (em triplicata), o qual foi submetido a quantificação de etanol pelo método do dicromato de potássio a 0,1M preparado em solução de ácido sulfúrico a 5M, segundo metodologia descrita por Isarankura-Na-Ayudhya *et al.* (2007). A partir do destilado foram coletados 300 µL, os quais foram transferidos para tubo de ensaio de 10 mL, seguidos da adição de 3 mL do reagente dicromato de potássio em ácido sulfúrico e homogeneização em aparelho Vórtex (QL 901 BiomiXer). A reação foi deixada em repouso por 15 minutos e a intensidade da cor formada foi determinada por espectrofotometria a 590 nm.

4.25 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente através do t-test pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As análises foram realizadas no programa Microsoft Office Excel 2007®, após o estabelecimento da curva de normalidade dos dados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química da massa seca de Aguapé

A caracterização centesimal da biomassa de Aguapé está descrita na Tabela 2. Os dados obtidos demonstraram um alto teor de umidade (83,05%), isto nos permite considerar que a cada tonelada de Aguapé são obtidos cerca de 200 kg de massa seca. Os teores de Cinzas (16,68%), Lipídios (3,5%), Proteínas (12,74%) e Fibra Bruta (67,02%) apresentaram resultados semelhantes ao estudo realizado por REZANIA *et al.*, 2015; GAO *et al.*, 2016, HENRY-SILVA e CAMARGO, 2006, NIGAM, 2002 que descreve resultados referentes a massa seca de *Eichhornia crassipes* com 70% de Fibra Bruta, 4,7% de Lipídeos, 25% de Cinzas e Proteínas 13%. O teor de cinzas é alto, em comparação com outros vegetais, por causa da propriedade desta planta em retirar substâncias inorgânicas dos corpos hídricos como os metais pesados.

TABELA 2- Composição química da Aguapé *in natura*.

Parâmetros	(%) Aguapé (<i>Eichhornia crassipes</i>)
Umidade	83,05±2,39
Umidade de Massa Seca	0,73 ± 0,52
Cinzas	14,68± 0,35
Proteínas	9,74± 0,23
Lipídeos	3,50± 0,25
Fibra Bruta	67,02± 0,12
FSDN	69,92± 1,05
FSDA	38,37± 1,25
Celulose	32,50± 1,32
Hemicelulose	28,61± 0,96
Lignina	7,46± 0,81
AST	1,98 ± 0,22
Amido	2,62± 0,46

A Aguapé, como a maioria de outras biomassas lignocelulósicas, apresenta variação em sua composição química, as quais estão relacionadas com vários fatores, tais como: fase de colheita, reservatório de origem, fatores climáticos e composição dos reservatórios de água. Os teores de celulose (32,50%), hemicelulose (28,61%) e lignina (7,46%), encontrados no presente estudo assemelham-se com os dados descritos por Reales-Alfaro, 2013 que propôs a produção

de etanol a partir do Aguapé através do pré-tratamento com ácido sulfúrico (2% v/v) e descreveu considerável fração de hemicelulose (21,33%) com baixo teor de lignina (4,40%) (Tabela 3). Os baixos teores de lignina apresentados pela Aguapé contribuem para a menor cristalinidade e recalcitrância da biomassa, o que reflete diretamente na melhor eficiência do processo de hidrólise e conversão dos açúcares em etanol. Outro aspecto interessante trata-se da concentração de carboidratos disponíveis que compreendem o somatório dos teores de Celulose (32,47%) + Hemicelulose (11,13%) + Amido (2,62%) e açúcares solúveis totais (1,98%) perfazendo um total de 48,20% de carboidratos. Esses dados refletem em uma projeção estequiométrica de 312 L de etanol por tonelada de massa seca, o que torna este resíduo uma matéria-prima com interessante potencial para produção de etanol.

TABELA 3 - Porcentagem das frações de celulose, hemicelulose e lignina em diferentes estudos.

Componentes	Nigam, (2002)	Gunnarsson e Petersen, (2007)	Reales-Alfaro <i>et al.</i> , (2013)	Dados do estudo
Celulose (%)	18,20	19,50	31,67	32,50
Hemicelulose (%)	48,70	33,40	27,33	28,61
Lignina (%)	3,50	9,30	4,40	7,46

5.2 Sacarificação enzimática da biomassa de Aguapé

Os resultados apresentados demonstraram que a hidrólise de Biomassa total apresentou 7,67g ($\pm 0,14$) de conversão em açúcares redutores (AR) no pico máximo de 16 horas (Figura 16). Os resultados obtidos no pico máximo de 16 horas para a condição de concentração de celulose em biomassa apresentou a taxa de 7,14g ($\pm 0,09$) de conversão em açúcares redutores (Figura 17), portanto a condição de hidrólise em Biomassa total apresentou maior porcentagem em conversão dos açúcares a partir da massa seca de Aguapé (Figura 18) ($p < 0,05$). Diante disso, pode-se considerar que a hidrólise em biomassa total obteve aproximadamente 24% de rendimento na conversão de AR, uma vez que a Aguapé estudada apresenta 32,50% de celulose (Tabela 3) em sua caracterização. Estudos realizados com a palha de cana-de-açúcar demonstraram resultados semelhantes no processo de sacarificação enzimática, alcançando *in natura* (sem qualquer tipo de pré-tratamento) o pico máximo de 7,2g de conversão de açúcares redutores (LUCARINI *et al.*, 2017). Segundo Alizadeh *et al.*, 2005 as biomassas submetidas a determinados métodos de pré-tratamento podem alcançar até 90% de rendimento na conversão

de açúcares redutores, entretanto, as biomassas *in natura* geralmente apresentam no máximo 20% de rendimento na conversão.

A redução no teor de açúcares redutores após 16 horas de hidrólise apresentou um perfil não esperado para a proposta experimental. Acredita-se que isto ocorreu devido à presença de microrganismos contaminantes, uma vez que os ensaios não foram realizados em ambiente estéril. Os resultados mostram que para tempos longos de reação seria necessário a adição de agentes microbicidas.

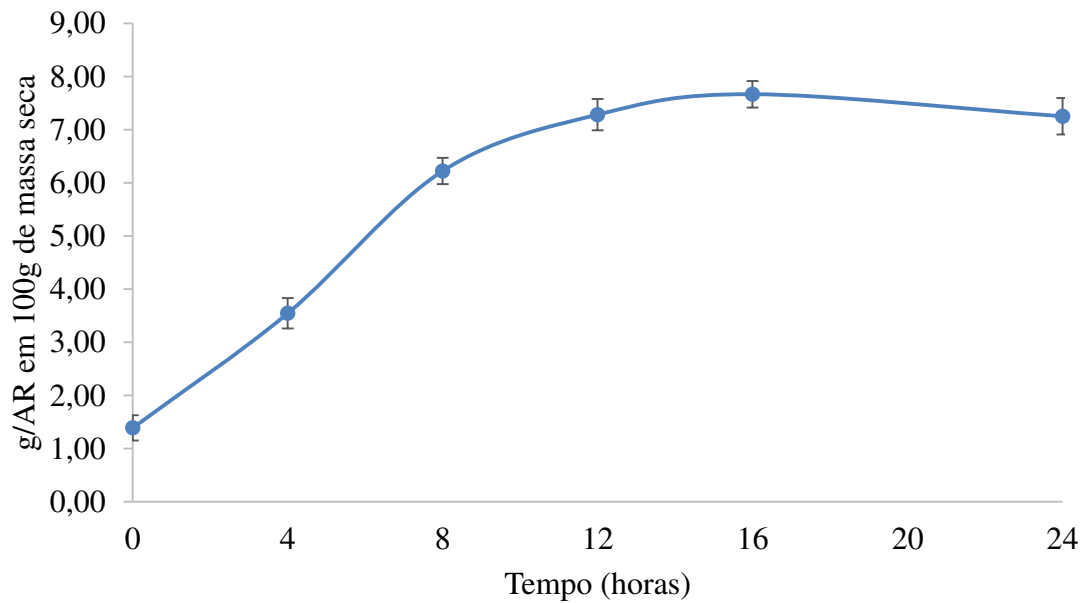


FIGURA 16- Porcentagem de açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise enzimática com enzima Celluclast® no período de 16 horas na condição Biomassa total.

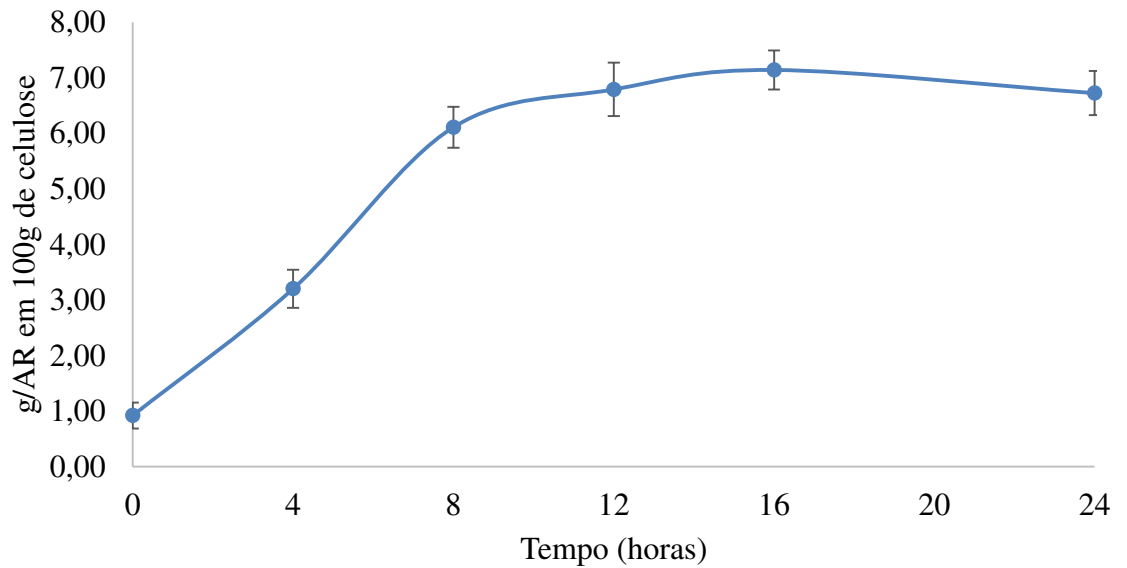


FIGURA 17- Porcentagem de açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise enzimática com enzima Celluclast® no período de 16 horas na condição Biomassa por concentração de celulose.

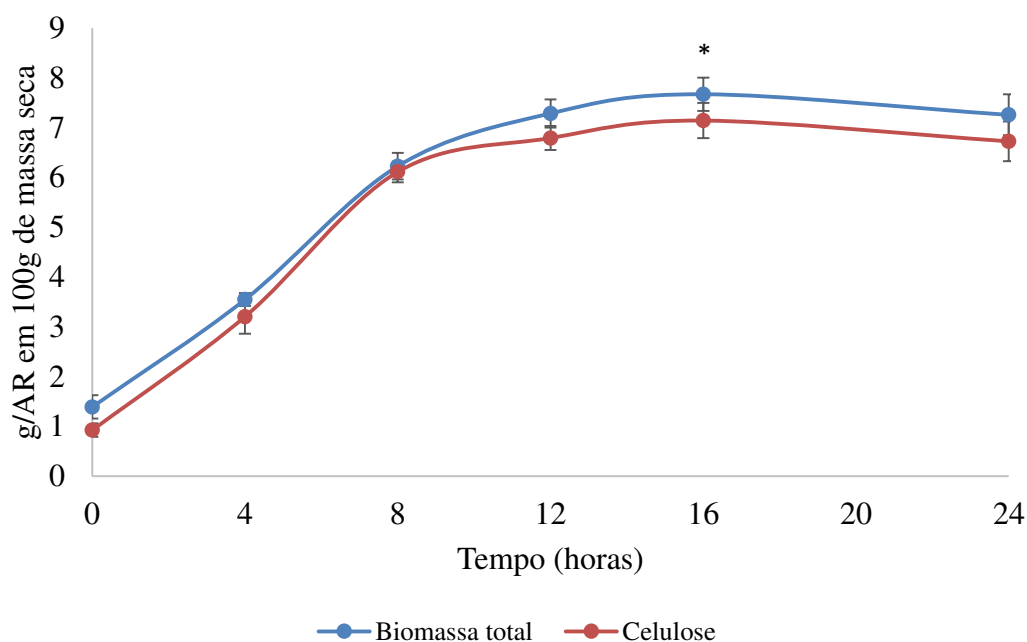


FIGURA 18- Porcentagem de açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise enzimática com enzima Celluclast® no período de 16 horas nas condições de biomassa total e concentração de celulose *($p < 0,05$).

5.3 Sacarificação enzimática da biomassa de Aguapé com diferentes tipos de pré-tratamento.

Os resultados obtidos através das hidrólises enzimáticas demonstraram o pico máximo de conversão de açúcares em 16 horas quando utilizado as duas enzimas Celluclast® e Cellic CTec2®. A análise comparativa entre os diferentes tipos de pré-tratamento, destaca-se o tratamento com ácido sulfúrico que apresentou 22,60g açúcares redutores sob uso da Celluclast® (Figura 19) e 24,74g utilizando o coquetel enzimático Cellic CTec2® (Figura 20). Diante dos resultados obtidos nas hidrólises da biomassa após tratamento ácido e comparando os diferentes compostos enzimáticos foi observado melhor rendimento utilizando a enzima Cellic CTec2® *($p < 0,05$) (Figura 21).

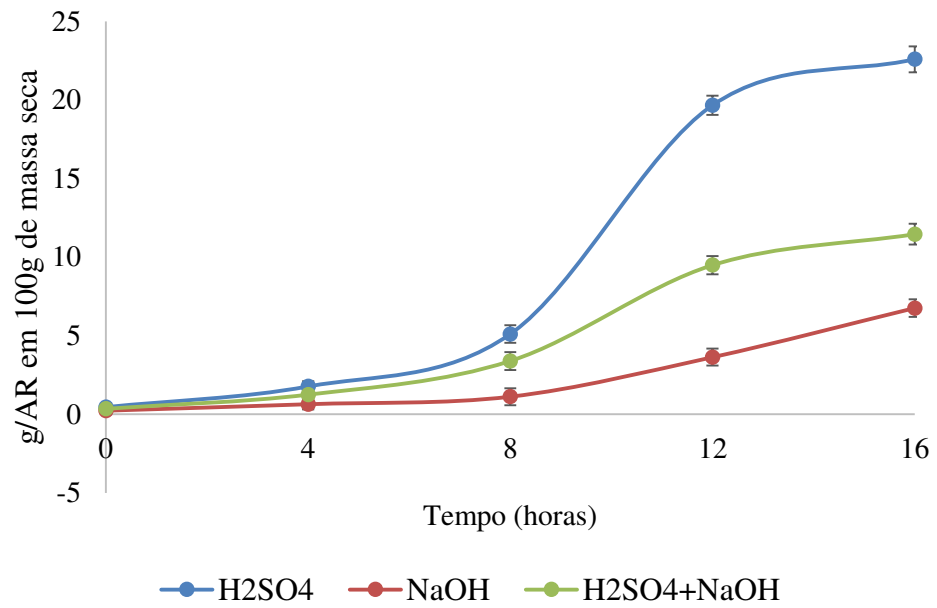


FIGURA 19- Porcentagem de açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise enzimática com enzima Celluclast[®] no período de 16 horas utilizando Agupé após diferentes tipos de pré-tratamento (ácido, básico e ácido+básico).

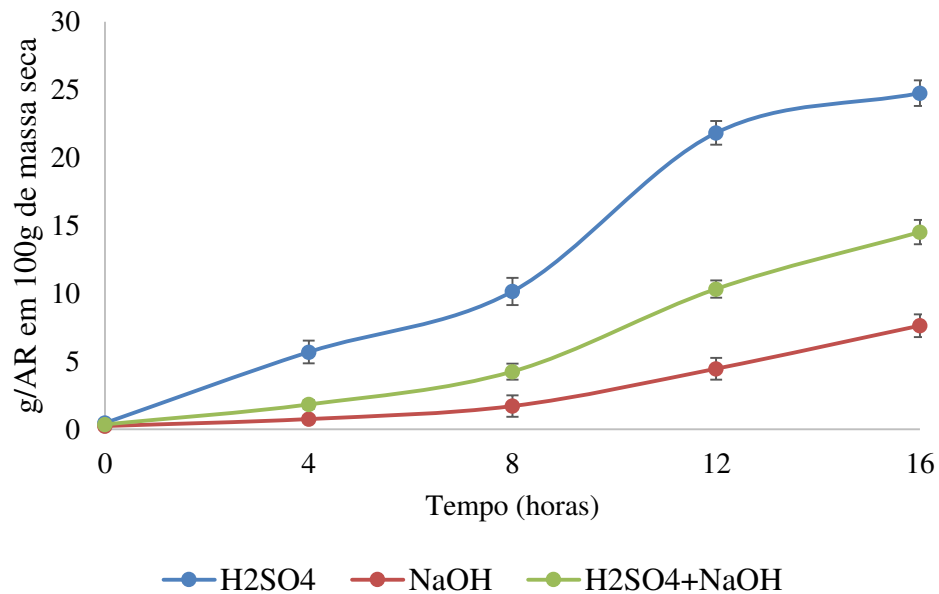


FIGURA 20- Porcentagem de açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise enzimática com enzima Cellic CTec2[®] no período de 16 horas utilizando Agupé após diferentes tipos de pré-tratamento (ácido, básico e ácido+básico).

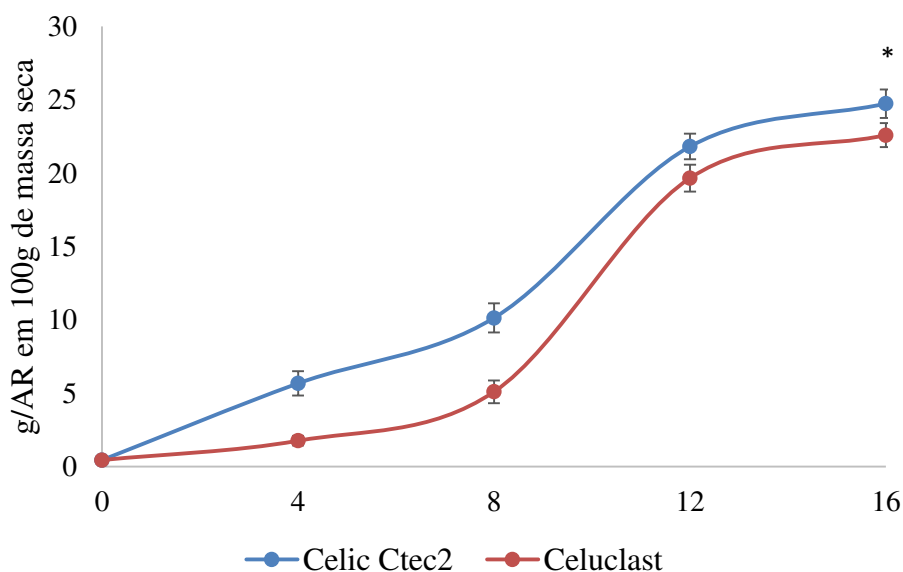


FIGURA 21- Porcentagem de açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise enzimática com as enzimas Cellic CTec2[®] e Celluclast[®] no período de 16 horas utilizando massa seca de Aguapé após pré-tratamento ácido (H₂SO₄) *p<0,05.

As diferentes tecnologias de pré-tratamento propostas nas reações de hidrólise visam aumentar a digestibilidade enzimática da biomassa lignocelulósica de Aguapé. O principal objetivo dos pré-tratamentos é alterar ou remover as frações de hemicelulose e/ou lignina, aumentando a área superficial permitindo maior acessibilidade das enzimas celulolíticas ao seu substrato (ASWATHI, *et al.*, 2013). Observa-se que a reação de hidrólise que apresentou melhor desempenho foi utilizando a enzima Cellic Ctec2[®] após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (p<0,05). Os resultados das hidrólises de palha de trigo utilizando as enzimas Celluclast[®] e Cellic CTec2[®] apresentaram maior conversão de açúcares redutores utilizando o coquetel Cellic CTec2[®], o que assemelha-se ao nosso estudo (RODRIGUES, *et al.*, 2015).

O melhor desempenho apresentado por este coquetel enzimático pode ser justificado pelas altas concentrações de β-glicosidases presentes no composto (ZHANG, HIMMEL, MIELENZ, 2006). A β-glicosidase é uma enzima que permite a conversão final da celobiose em glicose, o produto proporciona melhor eficiência ao hidrolisar substratos lignocelulósicos pré-tratados com maiores quantidades de sólidos totais, diferente da Celluclast[®] que apresenta em sua composição deficiência de celobiases, o que resulta em menor potencial na digestibilidade da celulose (KUMAR, 2016, MARTINS *et al.*, 2008; PIERRE *et al.*, 2011a,b).

O pré-tratamento ácido trata-se de uma alternativa utilizada para a remoção de hemicelulose e o pré-tratamento básico para a remoção de lignina. Portanto, a associação dos

tratamentos ácido e básico são utilizados para a remoção de ambas as fibras (YAN *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016).

A Aguapé apresenta 28,61% de hemicelulose em massa seca, o que representa uma fração interessante para o tratamento ácido, uma vez que a remoção da fibra pode impactar em maior efetividade da ação enzimática. A eficiência dos pré-tratamentos na reação de hidrólise fica mais evidente diante da análise de rendimento da conversão de açúcares redutores. Os diferentes pré-tratamentos alteram a concentração das fibras de celulose, hemicelulose e lignina, portanto, o cálculo de rendimento baseia-se na porcentagem de açúcares redutores que foi convertido diante da fração total de carboidratos disponíveis. O processo de pré-tratamento acarreta em perda de biomassa, é importante que haja boa eficiência na recuperação da mesma durante as sucessivas lavagens para que a etapa de sacarificação seja bem sucedida. Os resultados demonstraram através das hidrólises que o melhor desempenho apresentado foi diante do pré-tratamento ácido, representando 45,19% de rendimento na conversão de açúcares e menor porcentagem de perda de biomassa após tratamento 32,56% como apresentado na tabela 4. Os outros tratamentos utilizados apresentaram rendimentos inferiores ao tratamento ácido e maior percentual de perda de biomassa descritos em 14,98% de rendimento no tratamento alcalino com 56,44% de perda e 14,51% de rendimento diante do tratamento ácido e básico com 74,82% de perda de biomassa.

Segundo Das *et al.*, 2016 o pré-tratamento da Aguapé com ácido sulfúrico diluído apresentou maior eficiência quando comparado a outros tratamentos ácidos (HNO₃, HCl) e ao tratamento alcalino (NaOH) configurando-se como uma alternativa bastante viável para a produção de etanol a partir de Aguapé. Diante disso, foi proposto uma otimização do pré-tratamento ácido no intuito de estabelecer uma melhor performance na hidrólise enzimática utilizando a massa seca de Aguapé.

TABELA 4 - Caracterização da Aguapé após diferentes tipos de pré-tratamento, porcentagem de rendimento na conversão de AR e de perda de biomassa após sacarificação com a enzima Cellic Ctec2®.

Pré-tratamentos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	g/AR em 100g	% rendimento na conversão de AR	% de perda de Biomassa
Ácido	53,55	5,50	24,20	24,72	46,16	32,56
Alcalino	50,78	19,81	3,14	7,61	14,98	56,44

Ácido + Alcalino	63,40	5,20	0,39	14,51	22,89	74,82
---------------------	-------	------	------	-------	-------	-------

As hidrólise de material lignocelulósico como a palha de cana-de-açúcar utilizando a enzima Cellic CTec2[®] apresentaram 23,8% de conversão de celulose AR no período de 24 horas, resultados semelhantes aos obtidos em nosso estudo (LUCARINI *et al.*, 2017).

5.4 Planejamento experimental DCCR para a otimização do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído

No intuito de estabelecer a melhor condição para o pré-tratamento com ácido diluído foi proposto um planejamento experimental DCCR para a otimização do pré-tratamento ácido. As condições estabelecidas pelo delineamento experimental, bem como os resultados apresentados estão dispostos na Tabela 5.

Os resultados obtidos demonstraram que a máxima liberação de açúcares redutores presentes no hidrolisado (23,25%) ocorreu no ensaio que se refere à condição usada para o ponto central (15C, 16C, 17C e 18C). Diante disso, a condição estabelecida para a otimização do pré-tratamento ácido foi: 5% da concentração de H₂SO₄, 20 % de razão sólido-líquido e 35 minutos de reação.

TABELA 5: Delineamento Composto Central Rotacional, do tipo 2³ com dois níveis de variações, 3 fatores (concentração de H₂SO₄, razão S/L e tempo de hidrólise), 6 pontos axiais e 4 pontos centrais (15C, 16C, 17C, 18C), autoclavados à 1 atm a 120°C, com os respectivos fatores de resposta para o pré-tratamento ácido da massa seca de Aguapé.

Amostra	Pré-tratamento ácido Ácido Sulfúrico (%) (v/v)	Razão (S/L) (%)	Tempo (minutos)	Açúcar reduzores (hidrolisado)%
1	2,00	10,00	15,00	20,50
2	2,00	10,00	55,00	14,85
3	2,00	30,00	15,00	5,42
4	2,00	30,00	55,00	0,81
5	8,00	10,00	15,00	9,50
6	8,00	10,00	55,00	3,41
7	8,00	30,00	15,00	20,32
8	8,00	30,00	55,00	14,93
9	0,75	20,00	35,00	1,31

10	9,24	20,0,	35,00	21,29
11	5,00	5,85	35,00	21,56
12	5,00	34,14	35,00	12,35
13	5,00	20,00	6,71	20,03
14	5,00	20,00	63,28	17,71
15C	5,00	20,00	35,00	22,94
16C	5,00	20,00	35,00	23,25
17C	5,00	20,00	35,00	23,18
18C	5,00	20,00	35,00	22,87

É importante ressaltar que o teor de açúcares redutores liberados na condição do ponto central (23,2%) indica que o pré-tratamento ácido promoveu aproximadamente 82% da conversão das frações de hemicelulose (28,17%). A otimização do pré-tratamento ácido pode contribuir para maior eficiência na remoção das frações de hemicelulose e preservação das concentrações de celulose, o que pode ser significativo para melhor eficiência do processo de sacarificação (LU *et al.*, 2010)

Foi proposto um modelo ajustado para o planejamento experimental DCCR (Equação 4) apresentou um coeficiente de determinação (R²) de 90% para resposta AR (%).

$$y = 18,20 + 4,5X_1 - 4,06X_1^2 - 1,66X_2 + 1,34X_3 + 2,49X_1X_2 \quad \text{Equação 14}$$

onde:

X1: concentração de H₂SO₄;

X2: razão sólido-líquido (S/L) e

X3: tempo em minutos.

Os efeitos estimados das variáveis estudadas e suas interações encontram-se abaixo, na Tabela 6, e destacados na cor vermelha estão os efeitos significativos a $p < 0,05$.

TABELA 6 - Análise dos efeitos principais e de interações das variáveis do planejamento composto central para os percentuais de AR encontrados na Aguapé.

Effect Estimates; Var.:aguapé 2 AR %; R-sqr=,96786; Adj:,93171 (resultado prétratamento)
3 factors, 1 Blocks, 18 Runs; MS Residual=2,053431
DV: aguapé 2 AR %

Factor	Effect	Std.Err.	t(8)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	18,20583	0,675513	26,95112	0,000000	16,6481	19,76357	18,20583	0,675513	16,64810	19,76357
(1)H2SO4 %(L)	9,00729	0,827331	10,88716	0,000004	7,0995	10,91512	4,50364	0,413666	3,54973	5,45756
H2SO4 %(Q)	-8,16250	1,013270	-8,05560	0,000042	-10,4991	-5,82590	-4,08125	0,506635	-5,24955	-2,91295
(2)S/L%(L)	-3,32667	0,827331	-4,02096	0,003836	-5,2345	-1,41884	-1,66333	0,413666	-2,61725	-0,70942
S/L%(Q)	-1,22750	1,013270	-1,21142	0,260299	-3,5641	1,10910	-0,61375	0,506635	-1,78205	0,55455
(3)Tempo Min(L)	2,67476	0,827331	3,23300	0,012003	0,7669	4,58259	1,33738	0,413666	0,38347	2,29129
Tempo Min(Q)	0,76250	1,013270	0,75251	0,473300	-1,5741	3,09910	0,38125	0,506635	-0,78705	1,54955
1L by 2L	4,97250	1,013270	4,90738	0,001183	2,6359	7,30910	2,48625	0,506635	1,31795	3,65455
1L by 3L	-1,64750	1,013270	-1,62592	0,142619	-3,9841	0,68910	-0,82375	0,506635	-1,99205	0,34455
2L by 3L	-1,47750	1,013270	-1,45815	0,182910	-3,8141	0,85910	-0,73875	0,506635	-1,90705	0,42955

A análise do gráfico de Pareto representado na Figura 22 também possibilita observar os valores estimados dos efeitos de cada variável, bem como verificar se os mesmos foram ou não estatisticamente significativos a $p < 0,05$.

Os resultados encontrados indicam que o fator de maior relevância, a um nível de significância de 95% ($p < 0,05$), foi a concentração de ácido, sendo que esta apresentou um efeito linear significativo e positivo e um efeito quadrático significativo e negativo para a remoção de hemicelulose, representada pela liberação de açúcares redutores. O efeito linear positivo indica que o aumento da concentração de H_2SO_4 levou a uma maior liberação de AR para o meio (Figura 22).

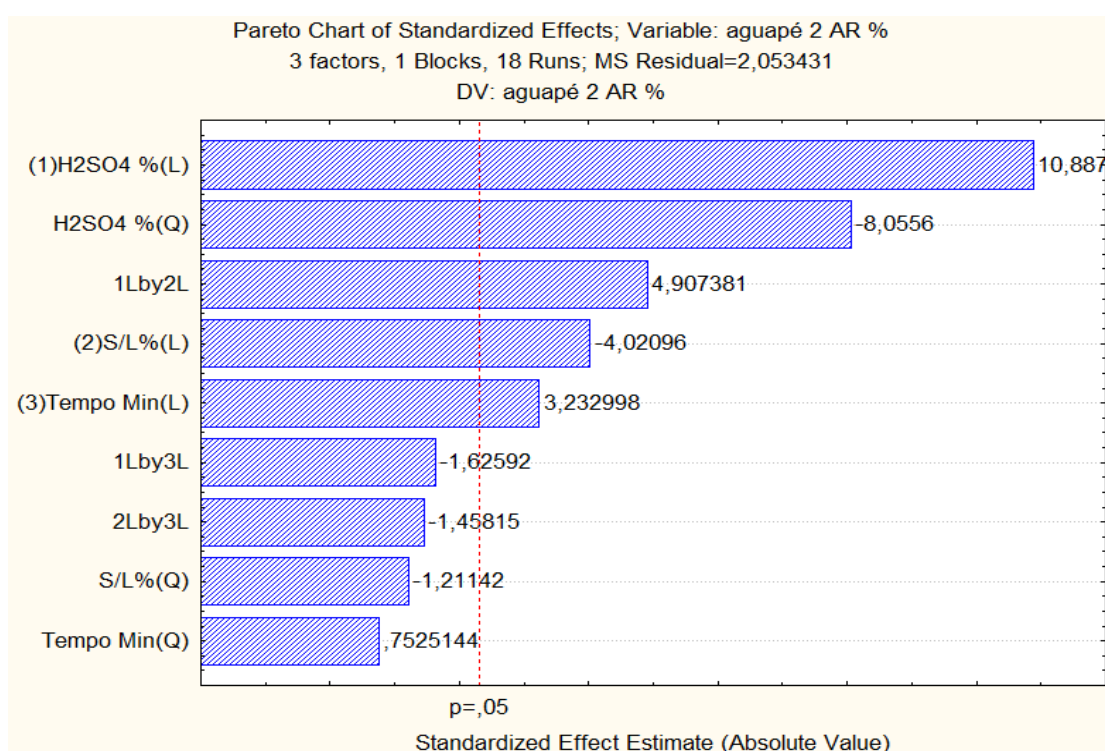
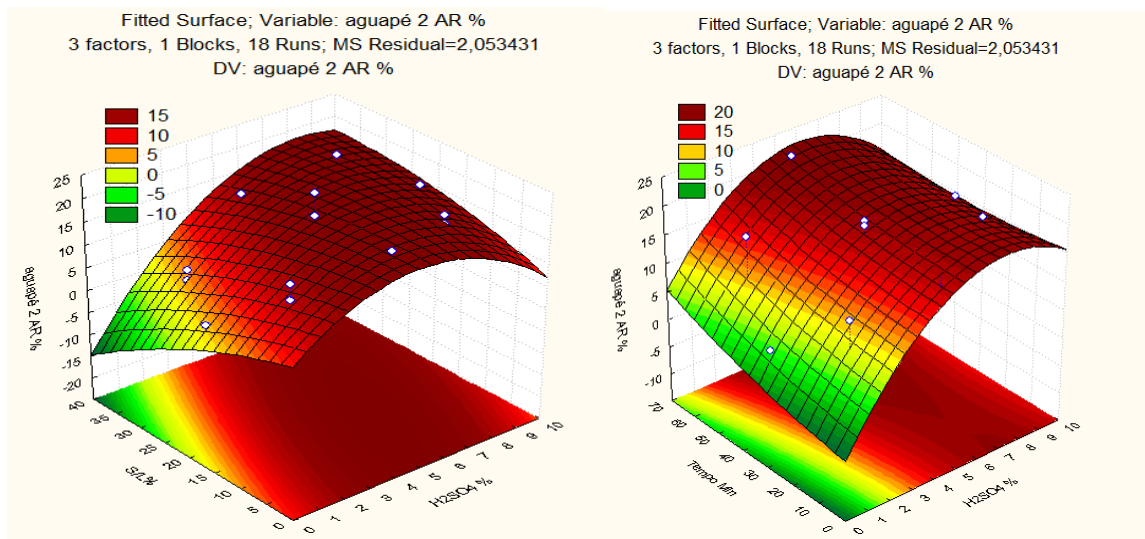


FIGURA 22- Gráfico de Pareto apresentando os efeitos dos fatores de respostas, em percentual de açúcares redutores sobre o processo de hidrólise ácida da Aguapé.

Em relação à razão sólido-líquido, observou-se um efeito linear negativo e significativo para o AR, o qual se deve, provavelmente, à limitação de transferência de massa e calor decorrente do aumento da fração sólida em detrimento da fase líquida, água, ao mesmo tempo solvente e reagente do processo, onde se encontra o agente catalisador (H_2SO_4).

O tempo apresentou um efeito linear positivo e significativo no processo de hidrólise ácida, consequência previsível da cinética de degradação de açúcares por hidrólise ácida.

Visando uma melhor análise dos efeitos combinados exercidos por cada fator sobre a liberação de AR, foram gerados gráficos de superfície de resposta (Figura 23). Nos gráficos apresentados observou-se que a máxima liberação de AR ocorreu numa faixa de valores de concentração H_2SO_4 de 3 a 7%, 20 a 35 minutos de pré-tratamento e razão sólido-líquido de 15 a 20%.



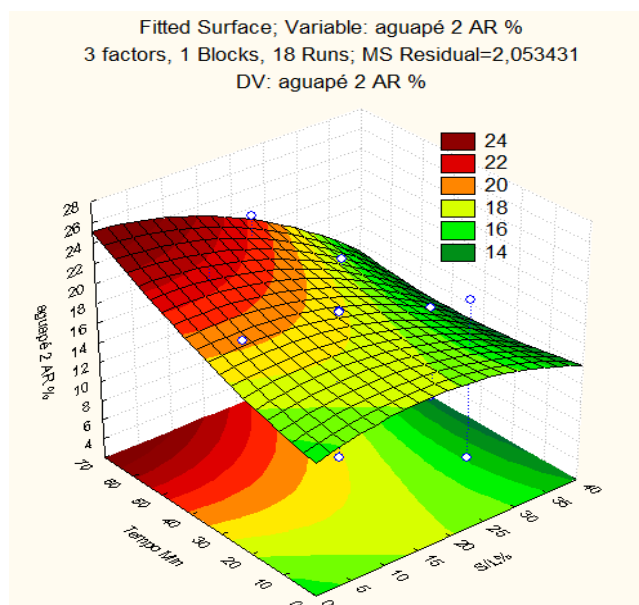


FIGURA 23- Gráficos de superfície de resposta para o percentual de açúcares redutores (AR%) removidos da torta de dendê em função dos efeitos combinados do tempo, concentração de H_2SO_4 e Razão S/L (razão sólido-líquido).

A caracterização química centesimal do resíduo sólido após o pré-tratamento ácido otimizado apresentou mudanças na composição química da Aguapé (Tabela 7). A concentração de celulose foi aumentada a 43,35% no sólido pré-tratado, concentração de hemicelulose foi reduzida a 5,52 % e a lignina obteve uma pequena redução à 6,73%, melhorar a eficiência do processo de sacarificação enzimática. As frações de lignina presentes na biomassa lignocelulósica representam condições prejudiciais à ação dos microrganismos, bem como a atividade enzimática. Portanto, os substratos com baixa concentração de lignina apresentam maior atividade enzimática (NANDA *et al.*, 2013).

TABELA 7: Comparação das frações de carboidratos e lignina do Aguapé (*Eichhornia crassipes*) antes e após o pré-tratamento ácido.

Frações	Antes do pré-tratamento ácido (%)	Após pré-tratamento ácido (%)
Celulose	32,54 ±0,86	43,35 ±0,46
Hemicelulose	28,61 ±1,16	5,52 ±0,17
Lignina	7,46 ±0,24	6,73 ±0,36

As alterações na caracterização química do resíduo sólido recuperado após o pré-tratamento ácido despertou o interesse em propor análises complementares para verificar as

possíveis alterações estruturais na massa seca de Aguapé. Portanto, a massa seca de Aguapé após pré-tratamento ácido otimizado foi submetida a análise de difração de raio-X (XRD) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

5.5 Análise de Difração de Raio-X (DRX)

Essa análise foi utilizada para estudar as alterações na estrutura cristalina do Aguapé nos diferentes pré-tratamentos. Os picos do gráfico de difração de Raio-X indicam a cristalinidade da matéria. As frações de hemicelulose e lignina possuem característica cristalina, enquanto a celulose é majoritariamente amorfa, conforme TASKER *et al.*, 1994 a celulose apresentou modificações na sua cristalinidade caracterizada pelos picos $2\Theta = 15^\circ$ e 24° . Portanto, pode-se assumir que houve uma diminuição na área cristalina no gráfico de DRX, o que significa remoção da hemicelulose e/ou da parte cristalina da celulose, em ambos os casos aumentando a acessibilidade à celulose amorfa (TASKER *et al.*, 1994; SATYANAGALAKSHMI *et al.*, 2011). A Figura 24 apresenta os gráficos da análise de difração de raio-X do Aguapé antes (G) e após pré-tratamento ácido otimizado (F).

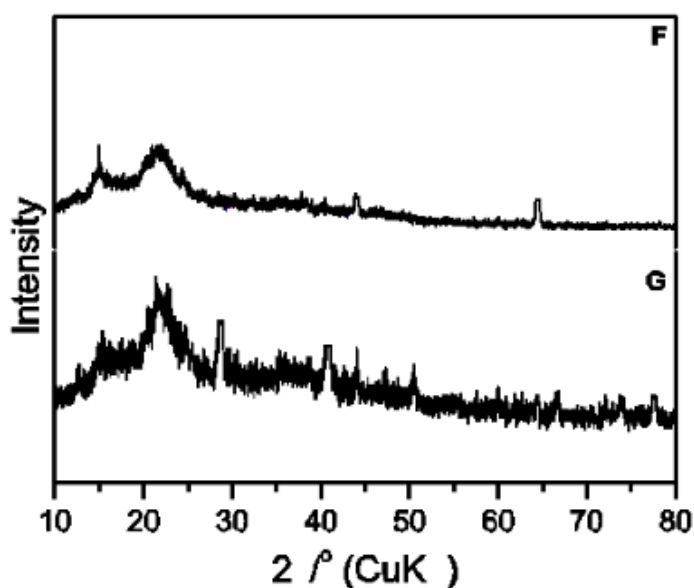


FIGURA 24- Análise de difração de raio-X da massa seca de Aguapé antes e após pré-tratamento com ácido sulfúrico otimizado (H_2SO_4 5% v/v).

A Figura 24 mostra que o Aguapé sem pré-tratamento apresenta um número reduzido de picos em torno de $2\Theta = 15^\circ$ e 24° . A equação de Buschle-Diller-Zeronian (Equação 12) permite calcular o grau de cristalinidade das amostras. A Tabela 8 apresenta estes índices.

TABELA 8- Índice de cristalinidade do Aguapé pré-tratado calculado pela Equação 12.

Condições	Índice de cristalinidade (%)
Aguapé sem pré-tratamento	47,64
Aguapé após pré-tratamento (H ₂ SO ₄ 5% v/v)	22,35

Através da Tabela 8 pode-se observar que o índice de cristalinidade para o Aguapé sem pré-tratamento é 47,64%, resultado similar aos 52,9% encontrado por Satyanagalakshmi *et al.*, (2011). Entretanto, o índice de cristalinidade após o pré-tratamento com ácido sulfúrico 22,35%, foi menor do que o encontrado na literatura de 26,63 %. O IC após o pré-tratamento apresentou diferenças significativas quando comparado ao Aguapé *in natura*, comprovando que o processo químico alterou as características da biomassa.

5.6 Análise da massa seca de Aguapé antes e após pré-tratamento ácido por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A Figura 25 apresenta os resultados da visualização de amostras da biomassa de Aguapé antes (A/B) e após (C/D) o pré-tratamento ácido otimizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Como pode ser visualizada na Figura 25 (A/B), a superfície da massa seca de Aguapé *in natura* apresenta uma estrutura vegetal bem organizada com fibras lisas, compactas e sem nenhuma ruptura, características da Aguapé sem o pré-tratamento. Isso ocorre devido a presença da camada protetora formada pela lignina e hemicelulose. Após o pré-tratamento ácido (Figura 25 C/ D), a superfície da estrutura apresenta uma aparência mais granular, com a presença de fendas ou canais, e a formação de uma parede celular estratificada destacada nas setas amarelas, podendo ser atribuído ao rompimento parcial das estruturas de hemicelulose do material lignocelulósico (KUMAR, *et al.*, 2009). Segundo Resende *et al.*, (2011) as várias camadas formadas indicam uma fibra com maior área superficial, enquanto as fendas caracterizam uma maior porosidade da fibra. A partir destas micrografias infere-se que o pré-tratamento contribuiu para maior desorganização física das fibras, resultando assim em uma maior acessibilidade para as enzimas durante a hidrólise enzimática.

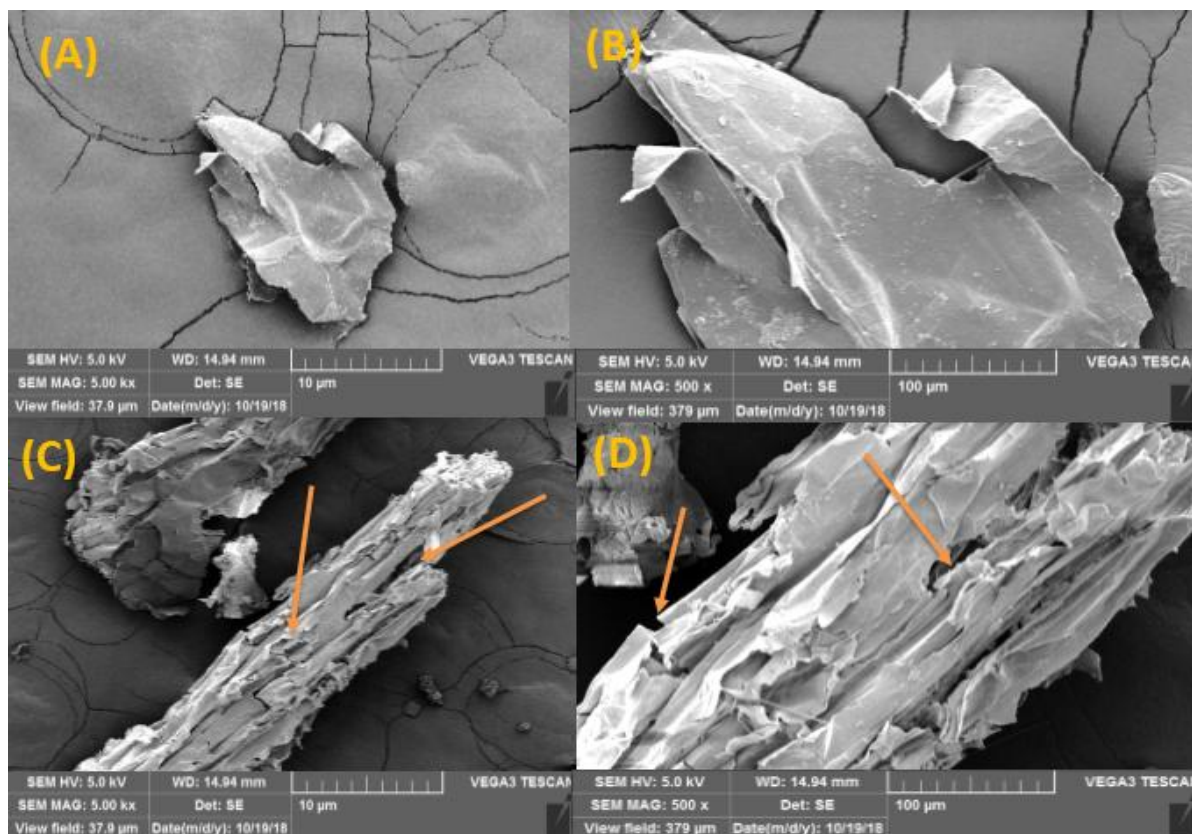


FIGURA 25- Análise da massa seca de Aguapé antes (A/B) e após pré-tratamento ácido otimizado (C/D) por MEV (Microscopia eletrônica por varredura) na ampliação de 50x (A e C) e 500x (B e D).

5.7 Sacarificação enzimática após a otimização do pré-tratamento

Os resultados da sacarificação após a otimização do pré-tratamento ácido demonstraram maior pico de conversão de açúcares redutores em 16 horas de hidrólise utilizando a enzima Cellic CTec2[®]. Os valores máximos obtidos através da hidrólise com a enzima Cellic CTec2[®] apresentaram 37,57g de AR/100g de massa seca, sendo assim, valores superiores aos 29,46g convertidos na hidrólise com Celuclast[®] *($p < 0,05$) (Figura 26). A conversão de AR por Cellic CTec2[®] proporcionou aproximadamente 87% de rendimento considerando a concentração de 43,35% de celulose após pré-tratamento ácido otimizado. Os dados apresentam valores superiores às hidrólises de Aguapé descritas no resultados obtidos por Reales-Alfaro *et al.*, 2013, Nigam 2002, Kumar *et al.*, 2009, Harun, *et al.*, 2011 como descrito na Tabela 9.

Diante disso, acredita-se que a hidrólise de Aguapé pode ser realizada apenas com o pré-tratamento ácido, pois a otimização do processo demonstrou desempenho satisfatório aos rendimentos de AR, não sendo necessário a submissão ao tratamento alcalino. A exclusão de

uma etapa de pré-tratamento pode impactar na redução de custos para a produção do etanol e em menor perda de biomassa.

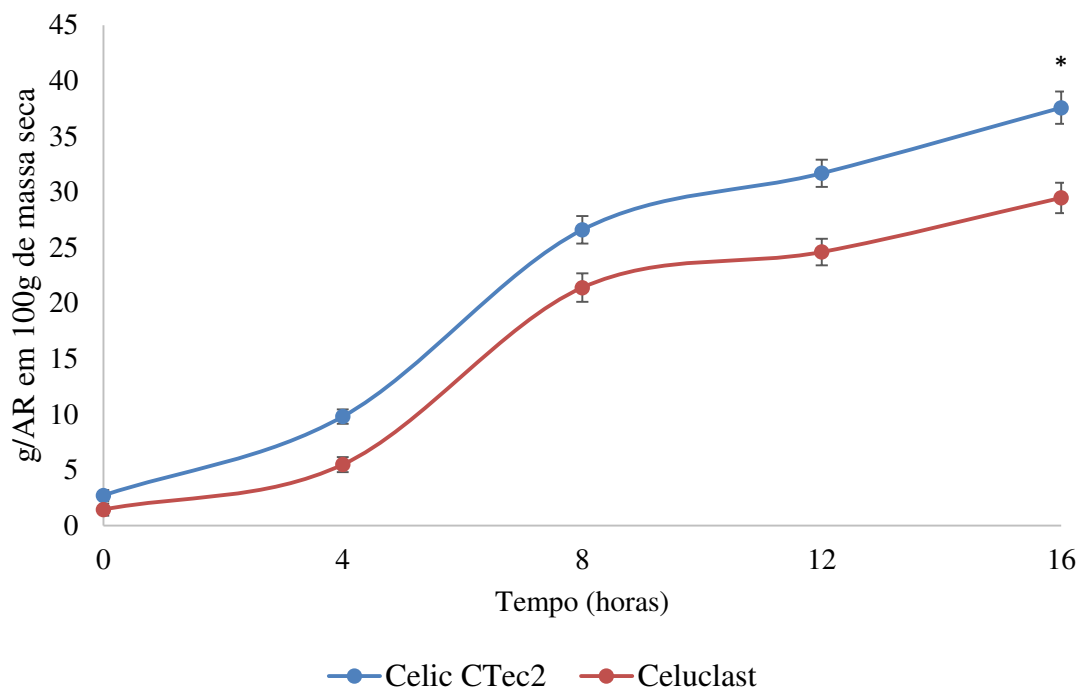


FIGURA 26- Porcentagem de açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise enzimática com as enzimas Cellic CTec2® e Celluclast® no período de 16 horas utilizando Agupapé após otimização do pré-tratamento ácido (H₂SO₄) combinado ao tratamento alcalino *p<0,05.

TABELA 9- Açúcares redutores obtidos em pré-tratamento ácido, g/100g de massa seca.

Referências	Reales-Alfaro <i>et al.</i> , (2013) H ₂ SO ₄ 2% (v/v)	Nigam, (2002) H ₂ SO ₄ 1% (v/v)	Kumar <i>et al.</i> , (2009) H ₂ SO ₄ 2% (v/v)	Harunet <i>al.</i> , (2011) H ₂ SO ₄ 5% (v/v)	Dados do estudo H ₂ SO ₄ 5% (v/v)
Açúcares redutores	29,33	21	18,8	12	37,57

5.8 Fermentação

A fermentação alcoólica foi realizada através de dois processos distintos: Sacarificação e Fermentação Simultânea e Sacarificação e Fermentação Separada. Em ambos os processos foi utilizado a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (marca Fleischmann®) como agente do processo durante aproximadamente 25 horas. O perfil do processo fermentativo foi expresso graficamente em função da quantidade de etanol produzido equivalente ao CO₂ desprendido

(Figura 27). Neste gráfico pode-se observar a habilidade da levedura em utilizar os carboidratos presentes no meio de fermentação através do desprendimento de CO₂ e das concentrações de etanol. A produção de etanol ocorreu rapidamente nas seis primeiras horas. Este fato está atrelado principalmente à presença de glicose, um açúcar facilmente fermentável.

O processo fermentativo de Sacarificação e Fermentação Separada apresentou maiores concentrações de etanol em comparação a Sacarificação Simultânea em todos os períodos analisados (6, 8, 12, 24 horas). Os resultados apresentados em 24 horas de fermentação demonstraram maior concentração de etanol 0,54g (SHF) e 0,49g (SSF) *(p<0,05). Os resultados apresentados foram superiores aos encontrados por Satyanagalakshmi, *et al.*, 2011 que obteve aproximadamente 0,29g de etanol utilizando a Aguapé após otimização do pré-tratamento com H₂SO₄ diluído.

A diferença entre os resultados dos processos pode ser explicada pelo fato que o SHF trabalha nas condições ótimas de pH e temperatura, o que proporciona uma melhor atividade enzimática da celulase e uma melhor atividade metabólica (fermentação) da levedura, o mesmo não ocorre no processo SSF pois ele trabalha em uma faixa intermediária dos valores ótimos de pH e temperatura da enzima e do microrganismo fermentescível (SUN; CHENG, 2002).

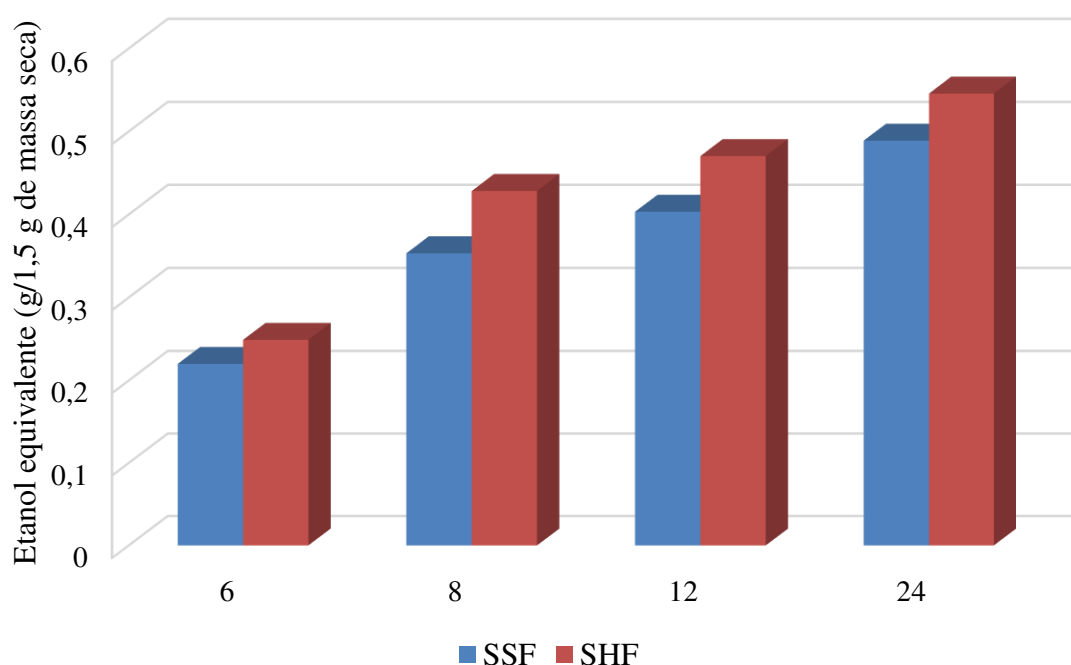


FIGURA 27—Produção de etanol obtidos com base no desprendimento de gás carbônico (CO₂) durante os processos fermentativos (SSF e SHF) de meios provenientes do hidrolisado de Aguapé pré-tratada.

A determinação do teor de etanol foi estabelecida através de amostras pré-destiladas e posteriormente quantificadas segundo método descrito por Pilone (1985), já os valores de eficiência hidrolítica final (E_f) foram calculados conforme equação 13.

Ao final do processo fermentativo foi possível observar as concentrações de glicose, etanol e variáveis de rendimento, estes valores estão apresentados na Tabela 10. Com base nos dados apresentados, pode-se observar que praticamente toda a glicose foi convertida em etanol. Entretanto, ao final do processo, foi observado uma pequena concentração residual de glicose 0,48 g/L (SSF) e 0,53g/L (SHF), o que indica a presença de açúcares não fermentescíveis. As concentrações de etanol obtidas após o processo de destilação demonstram melhor resultado através do processo de SHF 2,62 g/L quando comparado aos resultados de SSF 1,51 g/L. As concentrações de etanol obtidas em ambos os processos de SSF e SHF foram superiores aos 1,40 g/L descritos por Zhang *et al.*, 2018 utilizando Agupé após pré-tratamento ácido otimizado. O rendimento da produção de etanol e a eficiência fermentativa foram consideradas variáveis importantes do processo fermentativo. Como descrito nos resultados anteriores, o processo de SHF apresentou maior rendimento na produção de etanol SHF 0,50 Yp/s e na eficiência fermentativa 98% (E_f).

Os dados das variáveis do processo encontrados neste estudo foram superiores aos descritos por Sornvoraweat, Kongkiattikajorn (2010) que encontrou eficiência fermentativa (E_f) próximo a 96%, trabalhando com Agupé em sacarificação e fermentação separada, sendo a *S.cerevisiae* como agente fermentativo. Os valores obtidos para E_f , igualmente, foram superiores aos achados por Das, *et al.*, (2016) e Yan, *et al.*, (2015), utilizando a Agupé como insumo para produção de bioetanol em diferentes processos fermentativos com os valores de E_f de 83,14% e 86,22%, respectivamente.

TABELA 10- Variáveis dos processos fermentativos (SSF e SHF) utilizando como agente fermentativo a levedura *S. cerevisiae* após os pré-tratamentos ácido otimizado e posterior sacarificação enzimática.

Processo Fermentativo	G_i g/L	G_f g/L	Tempo (horas)	$EtOH_f$ g/L	Yp/s (g_p/g_s)	Q_p (g/L/h)	E_f (%)
SHF	5,93	0,53	25	2,62	0,50	0,109	98
SSF	3,40	0,48	25	1,51	0,49	0,062	96

Yp/s = rendimento de produção em etanol; Q_p = produtividade volumétrica e E_f = eficiência fermentativa
 G_i =glicose inicial G_f = glicose final

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização química da Aguapé (*Eichhornia crassipes*) resultou na determinação do valor de 48,20% de carboidratos totais, que se convertidos a etanol resultaria em 312L por tonelada de resíduo. O uso exclusivo da fração celulósica, 32,5%, permite projetar produção de 210L de etanol por tonelada de massa seca de Aguapé. Portanto, a biomassa de Aguapé apresenta boas condições para a produção do etanol de segunda geração.

Neste contexto, conclui-se que a melhor metodologia encontrada para a produção de etanol de segunda geração por meio de *Eichhornia crassipes* (Aguapé) é através do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. O processo de otimização do pré-tratamento ácido com o uso do planejamento DCCR demonstrou-se bem eficiente promovendo cerca de 85% da remoção de hemicelulose.

O processo de sacarificação enzimática da Aguapé após o pré-tratamentos ácido otimizado proporcionou conversão superior de 80% da celulose a glicose, onde a enzima Cellic CTec2® demonstrou melhor desempenho que o composto enzimático Celluclast®. A sacarificação e fermentação separada demonstrou melhor desempenho na produção alcoólica em relação a sacarificação e fermentação simultânea, produzindo cerca de 2,62 g/L de etanol.

O uso da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann®) mostrou-se adequada para a conversão dos açúcares derivados do pré-tratamento da Aguapé, obtendo-se $Y_{P/S}$ de 0,50 de rendimento de produção de etanol e 98% de eficiência fermentativa.

Portanto, podemos concluir que considerando o volume de Aguapé produzido anualmente em reservatórios aquíferos do Brasil e do mundo, é necessário propor alternativas para o aproveitamento desta matéria-prima para algum processo industrial, como por exemplo, a produção do etanol de segunda geração. Portanto, esta tecnologia é uma alternativa favorável para minimizar os problemas ambientais e econômicos causados pelo excesso de *Eichhornia crassipes* (Aguapé) nos rios brasileiros.

7. REFERÊNCIAS

ADITIYA, H.B., MAHLIA, T.M.I., CHONG, W.T., HADI NUR, SEBAYANG, A.H., **Second generation bioethanol production: A critical review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol 66. Pages 631–653. 2016.

AHMED, S., Luís, A.S., Brás, J.L.A., Ghosh, A., Gautam, S., Gupta, M.N., Fontes, C.M.G.A., Goyal, A., **A novel arabinofuranosidase of family 43 glycoside hydrolase (Ct43Araf) from Clostridium thermocellum releasing both α-L arabinofuranose and arabinopyranose from xylan side chains**. Plos One 8, e73575. [http:// dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0073575](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0073575). 2013.

AKHTAR, N., GOYAL, D., GOYAL, A. **Characterization of microwave-alkali-acid pre-treated rice straw for optimization of ethanol production via simultaneous saccharification and fermentation (SSF)**. Energy Conversion and Management 141 133–144. 2017.

AWASTHI, M., KAUR, J., RANA, S., **Bioethanol production through water hyacinth, Eichhornia crassipes via optimization of the pretreatment conditions**. Int. J. Emerg. Technol. Adv. Eng. 3, 42–46. 2013.

BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL. Brasília: MME, 2016.

BAEYENS, J.; KANG, Q.; APPELS, L.; DEWIL, R.; LV, Y.; TAN, T. **Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol**. Progress in Energy and Combustion Science 47 60-88. 2015.

BAI, F. W., ANDERSON, W. A., MOO-YOUNG, M., **Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks**. Biotechnology Advances, v.26, n.1, p.89-105. 2008.

BARROS, E. M.; RODRIGUES, T. H. S.; PINHEIRO, A. D. T.; ANGELIM, A. L.; MELO, V. M. M.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B.; **A Yeast Isolated from Cashew Apple Juice and Its Ability to Produce First- and Second-Generation Ethanol**. Appl Biochem Biotechnol, v. 174, p. 2762–2776, 2014.

BAYRAKCI, A. G.; KOÇAR, G. **Second-generation bioethanol production from water hyacinth and duckweed in Izmir: A case study**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 30, p. 306–316, 2014.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L., **Biochemistry**. 7ª edição. 2012. W. H. Freeman and Company. Nova Yorque (Estados Unidos).

BERGIER, L.; SALIS, M. M.; MIRANDA, C.H.B.; ORTEGA, E.; LUENGO, C.A. **Biofuel production from water hyacinth in the Pantanal wetland**. Ecohydrology & Hydrobiology, v.12, p. 77-84, 2012.

BRAR, K. K., AGRAWAL, D., CHADHA, B. S., HUNG LEE. **Evaluating novel fungal secretomes for efficient saccharification and fermentation of composite sugars derived from hydrolysate and molasses into ethanol**. Bioresource Technology. 2018

BREXÓ, R.P. and SANT'ANA S. **Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 73 423–434. 2017.

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. **Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal.** *Analytica*, v. 44, p.1-6, 2010.

CENBIO, Centro de Referência em Biomassa. Disponível em:<<http://cenbio.iee.usp.br>>. Acessado em: 07/2012. 2011.

CHENG, J., LIN, R., SONG, W., XIA, A., ZHOU, J., CEN, K.,. **Enhancement of fermentative hydrogen production from hydrolyzed water hyacinth with activated carbon detoxification and bacteria domestication.** *international journal of hydrogen energy* 40 2545 -2551.b. 2015.

CHENG, N., KODA, K., TAMAI, Y., YAMAMOTO, Y., TAKASUKA, T.E., URAKI, Y. **Optimization of simultaneous saccharification and fermentation conditions with amphipathic lignin derivatives for concentrated bioethanol production.** *Bioresource Technology* 232 126–132. 2017.

DAS, S.P., GUPTA, A., DAS, D., GOYAL, A., **Enhanced bioethanol production from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) by statistical optimization of fermentation process parameters using Taguchi orthogonal array design.** *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 109, 174–184. 2016.

DAS, A. PAUL, T., GHOSH, P.GHOSH, U., **Production of bioethanol as useful biofuel through the bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*).** *Biotech*, v. 6, n. 1, p. 70, 2016.

DE MELO, SILVA, R.P., SILVESTRE, A.J.D, SILVA, C.M.,. **Valorization of water hyacinth through supercritical CO₂ extraction of stigmasterol.** *Industrial Crops and Products* 80 177–185. 2016.

DONG, S., YI, C.F., LI, H., **Changes of *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane components and promotion to ethanol tolerance during the bioethanol fermentation.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 69 196–203. 2015.

EBRAHIMI, M., CAPARANGA, A.R., ORDONO, E.E., VILAFLORES, O.B., **Evaluation of organosolv pretreatment on the enzymatic digestibility of coconut coir fibers and bioethanol production via simultaneous saccharification and fermentation.** *Renewable Energy* 109 41-48. 2017.

EPE, Empresa de Pesquisa de Energética (2012) Disponível em:<<https://ben.epe.gov.br>>. Acessado em: 09/2012.

FAGUNDES, P.M., PADULA, A.D., PADILHA, A.C., **Interdependent international relations and the expansion of ethanol production and consumption: the Brazilian perspective.** Journal of Cleaner Production 133 616-630. 2016;

FRYDENDAL-NIELSEN, S., HJORTH, M., BABY, S. FELBY, C., GISLUM, R. **Comparing methods for measuring the digestibility of miscanthus in bioethanol or biogas processing** GCB Bioenergy 9, 168–175, 2017.

FRYDENDAL-NIELSEN, S., HJORTH, M., BABY, S. FELBY, C., GISLUM, R. **The effect of harvest time, dry matter content and mechanical pretreatments on anaerobic digestion and enzymatic hydrolysis of miscanthus.** Bioresource Technology 218 1008–1015. 2016.

GANGULY, A. CHATTERJEE, P.K., DEY, A. **Studies on ethanol production from water hyacinth—A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews 16 966–972. 2012.

GAO,Y. WU, K., YU, B., YUAN, Q., **Physicochemical, pyrolytic, and combustion characteristics of hydrochar obtained by hydrothermal carbonization of biomass.** BioResources. v. 11, n. 2, p. 4113–4133, 2016.

GOMEZ, L.D., WHITEHEAD, C., BARAKATE, A., HALPIN, C., MCQUEEN-MASON, J., **Automated saccharification assay for determination of digestibility in plant materials.** Biotechnology for Biofuels. 3-23.2010.

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

GRAY, K.A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. **Bioethanol: Current Opinion in Chemical Biology.** V.10, p 141-146, 2006.

GUNNARSSON, C. C. & PETERSEN, C. M. **Water hyacinths as a resource in agriculture and energy production: A literature review.** Waste Manag., 27(1), 117-129. 2007.

GUNJA, VIPIN, G., PRIYANKA, J., KANT, S.C., DIXIT, A.K., JAIN, R.K., **Production of bioethanol from water hyacinth by isolated thermotolerant bacteria.** Int. J. Curr.Sci. Technol. 4, 219–223. 2016.

GURGEL, L. V. A. **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar.** Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, A.F.M.. **Composição química de macrófitas aquáticas flutuantes utilizadas no tratamento de efluentes de aquíicultura.** Planta daninha, Viçosa , v. 24, n. 1, p. 21-28, 2006.

HARUN, M.Y.; DAYANG RADIAH, A.B.ZAINAL ABIDIN, Z.; YUNUS, R. **Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (Eichhornia crassipes).** Bioresource Technology, v.102, p.5193-5199, 2011.

IBRAHIM, H.A. **Pretreatment of straw for bioethanol production.** Energy Procedia 14 542 – 551. 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4. ed. São Paulo: IMESP, 2008.

IROBA, K.L.; TABIL, L.G. **Lignocellulosic biomass: Feedstock characteristics, pretreatment methods and pre-processing for biofuel and bioproduct applications, U.S. and Canadian perspectives**. Biomass Processing, Conversion and Biorefinery, Pages 61-97. 2013.

ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C. ; TANTIMONGCOLWAT, T.;KONGPANPEE, T.; PRABKATE, P.; PRACHAYASITTIKUL, V. **Appropriate Technology for the Bioconversion of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to Liquid Ethanol Future Prospects for Community Strengthening and Sustainable Development**. EXCLI Journal, v 6, p.167-176. 2007.

JUTURO, V.; WU, J.C. **Microbial cellulases: Engineering, production and applications**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 33, p. 188–203, 2014.

KAMER,S.B.V, GINKEL,V.,L..**Rapid determination of crude fiber in cereals**. Cereal Chemistry, Saint Paul, v. 19, n. 4, p. 239-251, 1952.

KARTAWIRIA, I.S., SYAMSU,K., NOOR, E., SAID, E.G. **Sorghum Stalk Juice Pre-treatment Method for Bioethanol** Fermentation Process. Energy Procedia 65 140 – 145.2015.

KOLHER, M. **Economic Assessment of Ethanol Production**. Science and Engineering. 505-521.2019.

KOK, S. **Metabolic engineering of free-energy (ATP) conserving reactions in *Saccharomyces cerevisiae***. Tese de Doutorado. Technische Universiteit Delft. Delft, Holanda. 2012.

KUMAR, M., SINGH, P., SUKLA, L.B. **Addition of expansin to cellulase enhanced bioethanol production**. Process Biochemistry 51 2097–2103.2016.

LAGAERT, S., POLLET, A., COURTIN, C.M., VOLCKAERT, G. **β -Xylosidases and α -L-arabinofuranosidases: Accessory enzymes for arabinoxylan degradation**. Biotechnology Advances 32 316–332.2014.

LEE, Y.G., YONG-SU,J., YOUNG-LOK,C., JIN-HO, S. **Bioethanol production from cellulosic hydrolysates by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae***. Bioresource Technology 228 355–361. 2017.

LIAO, H.; FAN, X.T.; MEI, X.; WEI, Z.; RAZA, W.; SHEN, Q.; XU, Y. **Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification**.Biomass and Bioenergy, v. 74, p. 122 – 134, 2015.

LIMA, N. C., OLIVEIRA, S.V.W.B., QUEIROZ, J.U., MARTINS, E.S., OLIVEIRA, M.M.B. **Considerações tributárias do combustível etanol hidratado**. Revista de Administração e Ciências Contábeis do IDEAU, Getúlio Vargas, v. 7, p. 1-15, 2013a.

LIMAYEM, A.; RICKE, S.C.; **Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects**, Progress in Energy and Combustion Science. doi:10.1016/j.pecs.2012.03.002, 2012.

LLOYD, J. B.; WHELAN, W. J. **An improved method for enzymic determination of glucose in the presence of maltose**. Analytical Biochemistry, v.30, p.467-470, 1969.

LUCARINI, A.C., DELQUIARO, A.C.T., VIDOCA, L.C.P.T., BRASZ, R., MARTINS, R.M., ALVES, T.P. **Estudo da hidrólise enzimática da palha da cana de açúcar para produção de etanol de segunda geração**. The Journal of Engineering and Exact Sciences - JCEC ISSN: 2446-9416. Vol. 03 N. 02 242–253. 2017.

LUO, G., STRONG, P.J., WANG, H., NI, W., SHI, W. **Kinetics of the pyrolytic and hydrothermal decomposition of water hyacinth**. Bioresource Technology, v. 102, p. 6990-6994, 2011.

MANIVANNAN, A., **Enhanced acid hydrolysis for bioethanol production from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) using fermenting yeast *Candida intermedia* NRRL Y-981**. Journal of Scientific Industrial Research., 71, 51. 2012.

MARTINS, L. F.; KOLLING D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; RAMOS, L. P., **Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates**, Bioresource Technology, v. 99, p. 1417–1424, 2008.

MAYER, F.D., FERIS, L.A., MARCILIO, N.R., HOUFFMANN, R., **Why small-scale fuel ethanol production in Brazil does not take off?**. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 43 687–701. 2015.

MCCREADY, R. M., GUGGOLZ, J., SILVIERA, V, e. OWENS, H. S. **Determination of Starch and Amylose in Vegetables**. Analytical chemistry. v.22,n. 9, p. 1156-1158.1950.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Anuário Estatístico da Agroenergia**: 2012. [On-line] MAPA, 2013. Disponível em: . Acesso em: 25 fev. 2017.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Governo estabelece adição de 27% de etanol na gasolina**. 2015. Disponível em: . Acesso em: 14 Jan 2017.

MME, Ministério de Minas e Energia. **Boletim mensal dos combustíveis renováveis**. Disponível em: <http://www.mme.gov.br>. Acessado em: 06/ 2017.

MOHAPATRA, S., MISHRA, C. BEHERA, S.S., THATOI, H. **Application of pretreatment, fermentation and molecular techniques for enhancing bioethanol production from grass biomass – A review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews 78 1007–1032. 2017.

MONTASSER, G.E., GUPTA, R., MARTINS, A.L., WANKE, P., **Are there multiple bubbles in the ethanol–gasoline price ratio of Brazil?** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52 19–23. 2015.

MOOD, S.H., GOLFESHAN, A.H., TABATABAEI, M., JOUZANI, G.S., NAJAFI, G.H., GHOLAMI, M., ARDJMAND, M. **Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27 77–93. 2013.

MORAES, M. L.; BACCHI, M. R. P. **Etanol do início às fases atuais de produção.** *Revista de Política Agrícola*, v. 4, p. 5–22, 2014.

NEGAHDAR, L.; DELIDOVICH, I.; PALKOVITS, R. **Aqueous-phase hydrolysis of cellulose and hemicelluloses over molecular acidic catalysts: Insights into the kinetics and reaction mechanism.** *Applied Catalysis B: Environmental* 184 285–298. 2016.

NEVES, P.V.; PITARELO, A.P.; RAMOS, L.P. **Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: Effect of extractives content, acid catalysis and diferente fermentation** *Technologies. Bioresource Technology* 208 184–194. 2016.

NANDA, S. KOZINSKI, J.A. DALAI, A.K. **Biomass-an overview on classification, composition and characterization.** *Biomass Processing, Conversion and Biorefinery*, Pages 1-35. 2013.

NIGAM, J. N. **Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast.** *J. Biotechnol.* 97(2), 107–116. (2002).

NOVA CANA. Aplicações e usos do etanol. Disponível em: Acesso em: 14 Jan 2017.

OGATA, B.H., **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial uso em biorrefinarias.** Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo. Piracicaba-SP, 2013.

OKEWALE, A.O., OMORUWOU, F., OJAIGHO, R.O., **Alternative energy production for environmental sustainability.** *Br. J. Renewable Energy* 1, 18–22. 2016.

PACHECO T. F, **Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração.** Circular Técnica 04. EMBRAPA, Brasília, DF . Abril, 2011.

PATEL, S. I.; PATEL, N. G. **Production of bioethanol using water hyacinth , an aquatic weed , as a Substrate.** *Environmental and Social Sciences*, v. 2, n. 1, p. 2–6, 2015.

PATEL, H. **Bioconversion of pretreated sugarcane bagasse using enzymatic and acid followed by enzymatic hydrolysis approaches for bioethanol production.** *Renewable Energy* 109 323 e 331. 2017.

PIERRE, G.; MAACHE-REZZOUG, Z.; SANNIER, F.; REZZOUG, S. A.; MAUGARD, T., **High-performance hydrolysis of wheat straw using cellulase and thermomechanical pretreatment.** *Process Biochemistry*, v. 46, p. 2194–2200, 2011a.

PIERRE, G.; SANNIER, F.; GOUDE, R.; NOUVIAIRE, A.; MAACHE-REZZOUG, Z.; REZZOUG, S. A.; MAUGARD, T., **Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from Brewers' spent grain.** *Journal of Cereal Science*, v. 54, p. 305-310, 2011b

PILONE, G. J. **Determination of ethanol in wine by titrimetric and spectrophotometric dichromate methods: collaborative study.** *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, v. 68, p. 188-190, 1985.

PITARELO, A.P., SILVA, A.S., PERALTA-ZAMORA, P.G., RAMOS, L.P. **Effect of moisture content in the steam treatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse.** *Química Nova*, v. 35, n. 8, p. 1502–1509, 2012.

PETROBRÁS. **Plano estratégico 2030 e plano de negócios e gestão 2014-2018.** Brasília, 2014.

PUBCHEM. **Ethanol.** Disponível em: . Acesso em: 14 Jan 2017.

PRIYA, E.S., SELVAN, P.S. **Water hyacinth (Eichhornia crassipes) – An efficient and economic adsorbent for textile effluent treatment – A review.** *Arabian Journal of Chemistry* 10, S3548–S3558. 2017.

RASTOGI, M., & SHRIVASTAVA, S., **Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 80 330–340. 2017.

REALES-ALFARO, J. G., TRUJILLO, L. T., ARZUAGA, G., CASTAÑO, H. & POLO, A. **Acid hydrolysis of water hyacinth to obtain fermentable sugars.** *CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro*, 5(2), 101-112. 2013.

REIS, V.R, ANTONANGELO, A.T.B.F, BASSI, A.P.G, COLOMBI, D., ANTONINI, S.R.C., **Bioethanol strains of Saccharomyces cerevisiae characterised by microsatellite and stress resistance.** *Brazilian journal of microbiology* 4 8 268–27.2017.

REZANIA, S., PONRAJ, M., DIN, M.F.M., SONGIP, A.R., SAIRAN, F.M., CHALLIAPAN, S. **The diverse applications of water hyacinth with main focus on sustainable energy and production for new era: An overview.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 41, p. 943–954, 2015.

ROMERO-GÜIZA, M.S., WAHID, R., HERNADEZ, V., MOLLER, H., FERNANDEZ, B. **Improvement of wheat straw anaerobic digestion through alkali pre-treatment: Carbohydrates bioavailability evaluation and economic feasibility.** *Science of the Total Environment* 595 651–659.2017.

SAMBO, S., FARUK, U.Z., SHAHIDA, A. **Ethanol production from fresh and dry water hyacinth using ruminant microorganisms and ethanol producers.** *Global Adv. Res. J. Biotechnol.* 4, 023–029. 2015.

SANCHES, A., and GOMEZ, D., **Analysis of historical total production costs of cellulosic ethanol and forecasting for the 2020-decade.** *Fuel* 130 100–104.2014.

SORNVORAWAWEAT, B., KONGKIATTIKAJORN, J.. **Separated hydrolysis and fermentation of water hyacinth leaves for ethanol production.** *KKU Research Journal*, 15, 9.2010.

SANTOS, F.A.; QUEIRÓZ, J.H. DE; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M. **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol.** *Quimica nova*, v.35, n.5, p.1004–1010, 2012.

SAHA, P., ALAM, M.F., BAISHNAB, A.C., KHAN, M.R., ISLAM, M.A., **Fermentable sugar production and separation from water hyacinth using enzymatic hydrolysis.** *Sustainable Energy* 2, 20–24. 2014.

SARKAR, N., GHOSH S.K., BANNERJEE S., AIKAT K. **Bioethanol production from agricultural wastes: An overview.** *Renewable Energy* 37 19e27.2012.

SASAKI, K., TSUGE Y., SASAKI D., HASUNUMA T., KONDO A., **Optimized membrane process to increase hemicellulosic ethanol production from pretreated rice straw by recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*.** *Bioresource Technology*, Volume 169, Pages 380-386, October 2014

SASMAL, S., GOUD, V. V., MOHANTY K. **Simultaneous ethanol and hydrogen production by fermentation from *Bon bogori (Ziziphus rugosa)*.** *Renewable Energy Focus*, Volume 26, Pages 71-80, September, 2018

SERNA, L.V.D.; C.E. ALZATE, O.C.E.; ALZATE, C.A.C. **Supercritical fluids as a green technology for the pretreatment of lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology* 199 113–120.2016.

SILVA, A. T. B., SPERS, R.G., WRIGHT, J.T.C., COSTA, P.R.. **Cenários prospectivos para o comércio internacional de etanol em 2020.** *Revista de Administração*, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 727-738, 2013.

SILVA, J.C., OLIVEIRA, R.C., NETO, A.S., PIMENTEL, V.C., SANTOS, A.A. **Extraction, Addition and Characterization of Hemicelluloses from Corn Cobs to Development of Paper Properties.** *Procedia Materials Science* 8 793 – 801.b.2015.

SILVA E. F. **Anatomia de órgãos vegetativos de *elais guineensis jacq.* (dende) afetados pela doença amarelecimento fatal.** Brasília, DF, 2009. In: III CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL, v. 3, Brasília. Anais XCVIII Brasília, DF, p. 25-26, 2009.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. **Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview.** *Bioresource Technology*, v. 199, p. 76–82, 2016.

SUN, Z; SHUPE, A.; LIU, T.; HU, R.; AMIDON, T.E.; LIU, S. **Particle properties of sugar maple hemicellulose hydrolysate and its influence on growth and metabolic behavior of *Pichia stipitis*.** *Bioresource Technology* 102 2133–2136.2011.

SURENDRA KC, KHANAL SK **Effects of crop maturity and size reduction on digestibility and methane yield of dedicated energy crop.** *Bioresource Technology*, 178, 187–193.2015.

SZAMBELAN, K., NOWAK, J., SWENGIEL, A., JELEA, H., AUKASZEWSKI, G., **Separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation methods in bioethanol production and formation of volatile by-products from selected corn cultivars.** *Industrial Crops and Products*. V. 118 Pages 355-361. 2018.

TÉLLEZ, T. R., LOPEZ E.M.R, GRANADO, G.L., PEREZ, E.A., LOPEZ, R.N., GUMAN, J.M.S., **The water hyacinth, *Eichhornia crassipes*: an invasive plant in the Guadiana River Basin (Spain).** *Aquatic Invasions*, v. 3, n. 1, p. 42–53, 2008.

TIMUNG, R.; MOHAN, M.; CHILUKOTI, B.; SASMAL, S.; BANERJEE, T.; GOUD, V.V. **Optimization of dilute acid and hot water pretreatment of different lignocellulosic biomass: A comparative study.** *Biomass and Bioenergy* 81 9-18.2015.

THI, N.T.B., ONG, L.K., NGUYEN, D.T., JU, T.Y.. **Effect of subcritical water pretreatment on cellulose recovery of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*).** *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 71 55–61.2017.

TOQUERO, C.& BOLADO, S. **Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing.** *Bioresource Technology* 157 68–76.2014.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. (2005). *Department of Energy Genome Programs Microbiologia*. 8° ed. Ed. Artmed, Porto Alegre, 894 p.2005.

UMMARTYOTIN, S.; MANUSPIYA, H. **A critical review on cellulose: From fundamental to an approach on sensor technology.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 41, p. 402–412, 2015.

UNICA. **União da Indústria de Cana-de-açúcar.** Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 22.jul. 2014.

VANSOEST, P. J. **Use of detergents in the analysis of fibrous feeds II. A rapid method of the determination of fiber and lignin.** *J. Assoc. Official Agr. Chem.*, v26, n.5, p.829-835. 1963.

VERARDI, A., BLASI, A., MOLINO, A., ALBO, L., CALABRO. **Improving the enzymatic hydrolysis of *Saccharum officinarum* L. bagasse by optimizing mixing in a stirred tank reactor: Quantitative analysis of biomass conversion.** *Fuel Processing Technology*, v. 149, p. 15–22, 2016.

YAN, J., WEI, Z., WANG, Q., HE, M., LI, S. and IRBIS, C. **Bioethanol production from sodium hydroxide-hydrogen peroxide-pretreated newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces marxianu* strain.** *Bioresource technology*. 2015,

YANG, M.; , KUITTINEN, S.; ZHANG, J.; VEPSÄLÄINEN, J.; KEINÄNEN, M.; PAPPINEN, A. **Cofermmentation of hemicellulose and starch from barley straw and grain for efficient pentoses utilization in acetone–butanol–ethanol production.** *Bioresource Technology*, v. 179, p. 128–135, 2015.

YOON, L.W., ANG, T.N., NGOH, G.C., CHUA, A.S.M. **Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production.** Biomass and bioenergy, v. 67, p. 319-338, 2014.

ZARPELON, F. **As especificações do álcool focadas para o mercado mundial.** Disponível em: Acesso em: 14 Jan 2017.

ZHANG, P. Y-H, HIMMEL, M.E., MIELENZ, J.R., **Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies.** Biotechnology Advances 24 452–481.2006.

ZHOU, Z., XUE, W., LEI, F., CHENG, Y., JIANG, J., SUN, D. **Kraft GL-ethanol pretreatment on sugarcane bagasse for effective enzymatic hydrolysis.** Industrial Crops and Products, v. 90, p. 100–109, 2016.

ZHENG, Y., JIAN, S., MOABING, T., CHENG, Y.S., **Principales and Development of lignocellulosic Biomass pretreatment of biofuels.** Advances in Bioenergy. 2017.

ZHENG, J.C. LIU, H., FENG, H., LI, W., LAM, M.H., LAM, P.K., YU, H. **Competitive sorption of heavy metals by water hyacinth roots.** Environmental Pollution 219 837-845.b. 2016.

ZHUANG, X.; WANG, W.; YU, Q.; WANG, W.Q.Q., TAN, X.; ZHOU, G.; YUAN, Z. **Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products.** Bioresource Technology 199 68–75.2016.