

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENERGIA DA BIOMASSA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ETANOL

KLEDSON LOPES BARBOSA

**PRODUÇÃO DE ETANOL 2G ATRAVÉS DE *Opuntia ficus-indica* UTILIZANDO
Saccharomyces cerevisiae E *Kluyveromyces marxianus***

Rio Largo

2015

KLEDSON LOPES BARBOSA

**PRODUÇÃO DE ETANOL 2G ATRAVÉS DE *Opuntia ficus-indica* UTILIZANDO
Saccharomyces cerevisiae E *Kluyveromyces marxianus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação Profissional em Energia da Biomassa da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Energia da Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Maria Rosas Garcia Almeida

Rio Largo

2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

B238p

Barbosa, Kledson Lopes.

Produção de etanol 2G através de *Opuntia ficus-indica* utilizando *Saccharomyces cerevisiae* E *Kluyveromyces marxianus* / Kledson Lopes
Barbosa.– 2015.

79 f. : il.

Orientador: Gildemberg Amorim Leal Junior.

Coorientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.

Dissertação (Mestrado Profissional em Energia da Biomassa) – Universidade Federal de Alagoas. Programa de Pós-Graduação em Energia da Biomassa. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2015.

Bibliografia: f. 49-57.

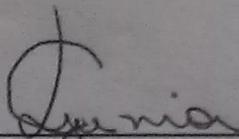
1. *Opuntia ficus-indica*. 2. Fermentação. 3. *S. cerevisiae*. 4. *K. marxianus*.
5. Etanol de segunda geração. I. Título.

CDU: 661.725

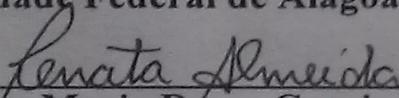
KLEDSON LOPES BARBOSA

PRODUÇÃO DE ETANOL 2G ATRAVÉS DE *Opuntia ficus-indica* UTILIZANDO
Saccharomyces cerevisiae E *Kluyveromyces marxianus*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Profissional em Energia da Biomassa da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Energia da Biomassa.

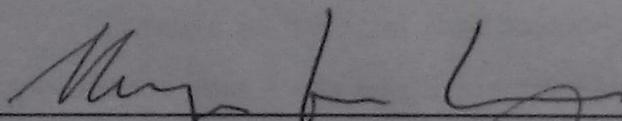


Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Júnior – Orientador
Universidade Federal de Alagoas – PPGEB/UFAL

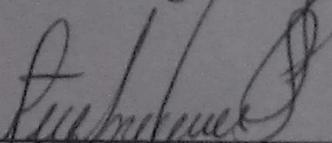


Prof.ª Dr.ª Renata Maria Rosas Garcia Almeida – Co-orientador
Universidade Federal de Alagoas – PPGEB/PPGEQ/UFAL

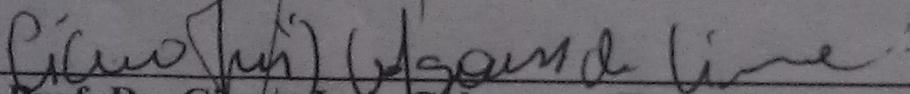
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Henrique Fonseca Goulart – Examinador Externo
Universidade Federal de Alagoas – RENOBIO/CECA - UFAL



Prof. Dr. João Inácio Soletti – Examinador Interno
Universidade Federal de Alagoas – PPGEB/PPGEQ/CECA - UFAL



Prof. Dr. Cicero Luiz Calazans – Examinador Interno
Universidade Federal de Alagoas – PPGEB- UFAL

Aos meus avós, José Lopes e Maria Lídia (*in memoriam*), Minha mãe Maria
Lopes e ao meu pai José Justino, e meus irmãos Kleiton e Maurício,
Responsáveis pela força adquirida para enfrentar as dificuldades e chegar até
aqui,

e a Deus,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Ciências Agrárias – CECA – UFAL, por contribuir na minha formação profissional.

Ao programa de Pós-graduação em Energia da Biomassa por acreditarem em mim; pela chance de fazer parte deste curso e pela experiência única de ter sido aluno da primeira turma do mestrado.

Ao coordenador do mestrado Prof. Dr. Guilherme Bastos Lyra, por sempre se mostrar disponível e acessível nas horas em que precisei de seu apoio.

Ao Prof. Dr. Cicero Luiz Calazans por aceitar ser membro da banca examinadora e por ter contribuído na minha formação com suas discussões e apontamentos em sala de aula.

A todos os professores do mestrado em Energia da Biomassa, por compartilhar suas experiências e saberes; por demonstrarem disponíveis para tirar dúvidas e contribuir significativamente na minha formação acadêmica e profissional.

Ao meu orientador, Gildemberg Amorim Leal Júnior, por ser além de ótimo pesquisador, um excelente orientador; por ter me tratado como profissional desde o primeiro encontro quando discutimos a orientação; por ter me dado à oportunidade de crescer e ser tão acessível quando o procurei.

A minha co-orientadora, Renata Maria Rosas Garcia Almeida, por me abrir as portas do laboratório, oferecendo toda infraestrutura necessária para realização deste trabalho e por aceitar prontamente o convite para ser minha co-orientadora. Serei eternamente grato.

A amiga, mestranda Margarete e coordenadora do Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos – LTBA, por apoiar meu projeto ao disponibilizar o laboratório sob sua coordenação para a realização dos experimentos, por ser parceira de nossas pesquisas, e por contribuir tanto todas as vezes que estive na bancada, sanando dúvidas e direcionando forma correta todas as análises.

Ao meu amigo Kinho, que sempre esteve disposto ajudar e me ouvir nos momentos de desabafo, momentos em que precisei você sempre soube me estender à mão; por ter acompanhado toda essa trajetória e por acreditar em mim.

As colegas de trabalho Ivone e Rubenita, por sempre me ajudarem nas trocas quando estava de plantão, para que eu pudesse ir às aulas ou realizar os experimentos no laboratório. Vocês duas contribuíram muito para a concretização deste sonho.

A minha coordenadora do Centro de Diagnóstico Unimed - CDU, Daniela Palmeira, por sempre facilitar minhas idas à universidade durante o curso de mestrado.

Aos alunos de iniciação científica Delly, Erika, Henrique, Victória, pela imensa ajuda nos experimentos. Foi ótimo estar com vocês em todos os momentos no LTBA.

A minha companheira de laboratório Rosana, por ter me ajudado nos tratamentos estatísticos.

A minha amiga Martha pela ajuda na caracterização química da palma.

Ao professor Teodorico, que com toda gentileza me cedeu quando necessário os cladódios da *Opuntia ficus-indica* para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação do CECA: Sr. Geraldo e Sr. Marcos, pela competência e por demonstrarem sempre acessíveis e resolutivos nos momentos de dúvidas e tramites necessário durante o curso de mestrado.

A todos que, de alguma forma, foram essenciais para a realização deste trabalho, sou imensamente grato a todos vocês.

Na multidão dos meus pensamentos dentro de mim, as tuas consolações recrearam a minha
alma.

(Salmo 94. 19)

RESUMO

A exigência energética tem crescido devido às pressões provocadas pelo controle da emissão de gases do efeito estufa devido à exploração de petróleo e seus derivados como fonte de energia. Uma alternativa para redução da emissão de gases causadores do efeito estufa é a mistura do etanol na gasolina com agente antidetonante. O incremento mundial gerado pela demanda por etanol requer a busca por processos alternativos para implementação da produção. Uma alternativa é a fermentação da biomassa lignocelulósica para produção de bioetanol. O grau de complexidade envolvido na estrutura e composição da biomassa lignocelulósica; e a disponibilização dos açúcares presentes na celulose e hemicelulose requerem processos de pré-tratamento na produção de etanol lignocelulósico. As etapas envolvidas na conversão dos açúcares em etanol são: pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação do hidrolisado. Nesse trabalho foi verificada a fermentabilidade da biomassa *Opuntia ficus-indica* pré-tratada e hidrolisada visando comparar a eficiência das cepas industriais de *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* para produção de etanol. Na metodologia empregou-se um planejamento experimental 2^3 visando obter a melhor condição investigada através das variáveis: concentração de ácido (0,5%, 1,0%), tempo do pré-tratamento (30min, 60min) e quantidade de massa (1g, 2g). Os melhores resultados foram encontrados no pré-tratamento na condição de 1,0% de ácido sulfúrico por 30 minutos com 2g de biomassa, sendo a condição escolhida para seguir as etapas de hidrólise enzimática e fermentação. A produção de etanol nas fermentações foi de 5,85 g L⁻¹ com *S. cerevisiae*, 5,15 g L⁻¹ com *K.marxianus* e 5,74 g L⁻¹ com processo conduzido com as duas espécies. O consumo de açúcares redutores durante a etapa de fermentação foi similar para as três condições de fermentação.

Palavras-chave: *Opuntia ficus-indica*. Fermentação. *S. cerevisiae*. *K. marxianus*. Etanol de segunda geração.

ABSTRACT

Energy demand has grown due to the pressures caused by the emission control of greenhouse gases and due to oil exploration and its derivatives as an energy source. An alternative to reduce emissions of gases that cause the greenhouse effect is mix ethanol in gasoline to oxygenated. The worldwide increase generated by the demand for ethanol requires the search for alternative processes for implementation of ethanol production. An alternative is the fermentation of lignocellulosic biomass to bioethanol production. The degree of complexity involved in the structure and composition of the lignocellulosic biomass; and the availability of sugars present in cellulose and hemicellulose require pre-treatment processes in the production of lignocellulosic ethanol. The steps involved in the conversion of sugars to ethanol are pre-treatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of the hydrolyzate. This work shows the results related to fermentability of pre-treated and hydrolyzed biomass *Opuntia ficus-indica* in order to compare the efficiency of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* for ethanol production. In the methodology, it was employed an experimental design 2^3 in order to obtain the best condition by the variables investigated concentration of acid (0.5%, 1.0%) pre-treatment time (30 min, 60 min) and the amount of mass (1g, 2g). The pre-treatment under the condition of 1.0% of sulfuric acid for 30 minutes with 2g of biomass was the best result, being the chosen condition to follow the enzymatic hydrolysis and fermentation steps. Ethanol production in the fermentation was 5.85 g L^{-1} with *S. cerevisiae*, 5.15 g L^{-1} at *K.marxianus* and 5.74 g L^{-1} with the process conducted with the two species. The consumption of reducing sugars during the fermentation stage were similar for the three fermentation conditions.

Key Word: *Opuntia ficus-indica*. Fermentation. *S. cerevisiae*. *K. marxianus*. Ethanol of second generation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma esquemático da produção de etanol de segunda geração a partir de materiais lignocelulósicos.

Figura 2 – Regiões ordenadas demonstrando as repetições das unidades de celobiose através de ligações β -glicosídicas.

Figura 3 – Estrutura parcial das hemiceluloses demonstrando as Pontes de hidrogênio entre as unidades de xilana.

Figura 4 – Estrutura geral da Lignina apresentando os principais tipos de ligações entre as unidades fenilpropanóides e seus resíduos fenólicos.

Figura 5 – Ilustração esquemática da estrutura química da pectina mostrando resíduos de ácido urônico e grupos metilados.

Figura 6 – Ilustração esquemática do processo designado à produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica. *SHF* (*separate hydrolysis na fermentation*): hidrólise e fermentação separada; *SSF* (*simultaneous Saccharification and fermentation*): sacarificação e fermentação simultânea.

Figura 7 – Polímeros de celulose, hemicelulose e Lignina desestruturados com o efeito do pré-tratamento sobre a biomassa lignocelulósica.

Figura 8 - Sistema de ação enzimática envolvendo a degradação através do processo de despolimerização do polímero de celulose.

Figura 9 – Fluxograma das etapas experimentais envolvidas no processamento, análise e fermentação da *Opuntia fícus-indica* Mill.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição média dos cladódios de *Opuntia ficus-indica* Mill.

Tabela 2 – Porcentagem geral da composição dos polímeros e seus monômeros que constituem a biomassa lignocelulósica.

Tabela 3 – Vantagens e desvantagens do método de pré-tratamento físico.

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens do método de pré-tratamento químico.

Tabela 5 – Variáveis do planejamento utilizadas na etapa de pré-tratamento.

Tabela 6 – Diluições para o preparo da curva padrão de glicose.

Tabela 7 – Quantificação dos monômeros de pentose, hexose e outros compostos estruturais presentes na palma forrageira *Opuntia ficus-indica in natura* investigados neste estudo e comparados com outros trabalhos.

Tabela 8 – Porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina da *Opuntia ficus-indica in natura*.

Tabela 9 – Matriz de planejamento fatorial com todas as condições estudadas.

Tabela 10 – Valores de ART, AR, BRIX e Rendimento mássico obtidos em todas as condições do planejamento experimental do pré-tratamento ácido.

Tabela 11 – Resultados obtidos após hidrólise enzimática e fermentação.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	Enzima Álcool Desidrogenase
AR	Açúcares Redutores
ART	Açúcares Redutores Totais
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca(OH) ₂	Hidróxido de Sódio
C ₂ H ₆ O	Etanol
CH ₃ CH ₂ OH	Etanol
CO	Monóxido de Carbono
CECA	Centro de Ciências Agrárias
CLAE	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
CO ₂	Dióxido de Carbono
DNS	Ácido 3,5 - dinitrosalicílico
EUA	Estados Unidos da América
E1G	Etanol de Primeira Geração
E2G	Etanol de Segunda Geração
F1, F2, F2	Fermentação 1, 2, 3.
HMF	Hidroximetil
H ₂ O	Água
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
K.m	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
L	Litros

M	Mol
Min	Minutos
mL	Micro litros
mm	Milímetros
NADH	Nicotamina Adenina Dinucleótido
NaOH	Hidróxido de sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
PTA	Pré-Tratamento
S.c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SHF	Sacarificação e Fermentação Separada
SO ₂	Dióxido de enxofre
SSF	Sacarificação e Fermentação Simultânea
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
v/v	Volume/Volume
YPD	Yeast Peptone Dextrose
° C	Grau Celsius

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva padrão de glicose plotando absorvância x concentração. Através da regressão linear, é determinada a equação da curva e o coeficiente de correlação, onde $y=$ é o valor da absorvância obtida.

Gráfico 2 – Curva de Calibração do dicromato de potássio obtida em espectrofotômetro demonstrando a linearidade pela influência das concentrações de álcool.

Gráfico 3 - Ajuste ao Modelo Linear demonstrando os valores observados *versus* valores previstos de ART em (g.L^{-1}).

Gráfico 4 – Influência dos fatores no planejamento experimental 2^3 e o efeito significativo do valor absoluto a partir das variáveis: massa, concentração de ácido e tempo.

Gráfico 5 – Superfície de resposta da influência da massa sobre concentração de ácido em relação ao percentual de ART.

Gráfico 6 – ART's obtidos dos pré-tratados ácidos e pós-hidrólise.

Gráfico 7 – AR's obtidos dos pré-tratados ácidos e pós-hidrólise.

Gráfico 8 – Cinética do consumo de AR determinada a cada 3 horas durante início e final da fermentação (24 horas).

Gráfico 9 – Viabilidade celular das leveduras *S. cerevisiae*, *K. marxianus* e MIX obtidas no final da etapa de fermentação (24 horas).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Geral	18
1.1.2 Específicos	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Combustível fóssil	19
2.2 Etanol	20
2.3 Etanol de Primeira Geração (E1G)	22
2.4 Etanol de Segunda Geração (E2G).....	23
2.5 <i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	25
2.6 Composição da biomassa lignocelulósica	27
2.7 PRÉ-TRATAMENTOS	31
2.7.1 Etapas de pré-tratamento	31
2.7.2 Pré-tratamento por fragmentação	33
2.7.3 Pré-tratamento físico	33
2.7.4 Pré-tratamento químico e formação de substâncias inibidoras	35
2.7.5 Pré-tratamento biológico	37
2.8. HIDRÓLISE	38
2.8.1 Hidrólise ácida	38
2.8.2 Hidrólise enzimática	38
2.9 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOETANOL	40
2.9.1 Fungos	40
2.9.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
2.9.3 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Matéria prima	45
3.2 Extrato enzimático	45
3.3 Microrganismos utilizados	45
3.4 Higienização, secagem e trituração para obtenção da farinha	45
3.5 Extrativos	46
3.5.1 Hidrólise com Ácido Sulfúrico 72%	46

3.5.2 Determinação de Lignina Insolúvel na Fração sólida	47
3.5.3 Determinação de Lignina Solúvel na Fração Líquida	47
3.5.4 Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e Hidroximetilfurfural.....	47
3.5.5 Determinação de Proteínas	48
3.5.6 Determinação de resíduo mineral fixo (cinzas)	59
3.5.7 Determinação de Fibra	50
3.6. PRÉ-TRATAMENTO	50
3.6.1 Pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído	50
3.6.1.1 Planejamento para o pré-tratamento	51
3.6.1.2 Determinação dos sólidos totais (BRIX)	52
3.6.1.3 Determinação dos açúcares redutores totais	52
3.6.1.4 Preparo da Solução de Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	52
3.6.1.5 Hidrólise dos açúcares Não-redutores	52
3.6.1.6 Reações para determinação dos açúcares pelo método do DNS	53
3.6.1.7 Preparo da Curva Padrão da glicose	53
3.7 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	54
3.8. FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO	55
3.8.1 Preparo do inóculo.....	55
3.9 DESTILAÇÃO	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
4.1 Caracterização da <i>Opuntia ficus-indica</i> Mill.....	58
4.2 Matriz de planejamento do pré-tratamento ácido	61
4.3 Hidrólise enzimática.....	65
4.4 Fermentação do hidrolisado	66
4.5 Viabilidade celular.....	68
5 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

As pressões provocadas pela necessidade em reduzir a emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa tem crescido a demanda por etanol. A fermentação da biomassa lignocelulósica para produção de bioetanol tem demonstrado uma alternativa para suprir a demanda mundial do produto. A utilização e exploração do combustível renovável poderá diminuir a competição entre terras agricultáveis produtoras de alimentos e culturas energéticas.

Tradicionalmente as matérias-primas lignocelulósicas investigadas para a produção de energia têm sido os resíduos agrícolas como a palha do milho e o bagaço da cana-de-açúcar. Entretanto, em algumas partes do mundo, devido suas condições climáticas severas como das regiões áridas e semiáridas estas culturas energéticas não estão disponíveis, o que leva a procura de outras fontes de biomassa que estejam disponíveis na própria região.

A busca constante por matérias-primas capazes de produzir biocombustíveis em regiões críticas despertou o interesse em pesquisar a cactácea conhecida como *Opuntia ficus-indica*. A espécie *O. ficus-indica*, conhecida com palma forrageira, sobrevive em ambientes áridos, desfavorável ao crescimento de outra cultura. A palma forrageira tem atraído a atenção pela sua ampla difusão do cultivo em regiões semi-árida, fácil plantio e resistência à seca. A cultura é utilizada na alimentação humana, alimentação animal, produção de corante, remédios, serve de abrigo para animais nas regiões áridas. Os teores médios de celulose (12-23%), hemicelulose (15-24%) e lignina (8-16%) nos cladódios faz da *O. ficus-indica* uma fonte de biomassa para produção de etanol.

O cultivo da palma no Nordeste é viabilizado pelas condições climáticas favoráveis, o que permite altas produtividades da biomassa e facilitando a produção etanol de segunda geração em escala industrial. A palma é uma cultura que resiste muito bem a regiões secas, onde outras culturas não conseguiria permanecer viável e essa condição traduz mais um fator de importância para essa biomassa como proposta de inovação para produção de etanol lignocelulósico.

A motivação para esse estudo surgiu através do interesse despertado na área da energia da biomassa e pela percepção de que a cultura *O. ficus-indica* representa uma alternativa para produção de etanol. Nesse sentido, o desenvolvimento deste, foi norteado pela seguinte questão: A biomassa *O. ficus-indica* é uma candidata adequada para a produção

de etanol por conter açúcares fermentescíveis passíveis de serem assimilados e convertidos em etanol pelas principais leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*? Neste estudo, foi investigada a produção de E2G utilizando a biomassa lignocelulósica. *O. fícus-indica* Mill após os processos de pré-tratamentos (ácido diluído, hidrólise enzimática e fermentação).

O presente trabalho irá contribuir para apreensão e conhecimento sobre a produção de E2G através da biomassa *O. fícus-indica*, e estimular o desenvolvimento de outras pesquisas para corroborar com o desenvolvimento científico e de outras tecnologias no campo das energias renováveis.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Verificar e comparar a fermentabilidade da biomassa *O. fícus-indica* pré-tratada e hidrolisada pelas espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*.

1.1.2 Específicos

Realizar a caracterização físico-química da matéria-prima *O. fícus-indica*;

Estudar o pré-tratamento ácido verificando a influência das variáveis: concentração de ácido sobre o processo, tempo e quantidade de massa;

Realizar as etapas de hidrólise enzimática e fermentação da melhor condição de pré-tratamento ácido;

Avaliar o desempenho da fermentação etanólica da *O. fícus-indica* oriunda dos pré-tratamentos empregando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Combustível fóssil

No final do século 19 e início do século 20, o desenvolvimento industrial e social presenciaram a descoberta e exploração do petróleo e de seus derivados. O petróleo representou uma matéria prima economicamente barata para produção de produtos químicos e combustíveis de transportes (VAN MARIS et al., 2006). Entretanto, existem afirmações de que esse recurso não renovável possa se esgotar e afete diretamente as exigências globais de energia nos setores de combustíveis (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

Acredita-se que a combustão de materiais de origem fóssil como o carvão e o petróleo, levaram ao aumento considerável dos níveis de emissões de gases do efeito estufa e causando mudanças climáticas como o aquecimento global (RAGAUSKAS et al., 2006). Por essa razão tem aumentado a busca por alternativas para redução das emissões com a utilização de biocombustíveis (FOFANA; CHITIGA; MABUGU, 2009).

Estudos apontam que os veículos movidos a motor são responsáveis pela emissão de 70% de monóxido de carbono (CO) e 19% das emissões de dióxido de carbono (CO₂) no mundo. Existem estimativas de que esses números cresçam, saltando-se de 700 milhões de automóveis para 1,3 bilhões no ano de 2030, e aumento de 2 bilhões de veículos para ano de 2050. Por essa razão, se tem questionado sobre a disponibilidade de reserva mundial de petróleo (BALAT; BALAT, 2010).

A dependência dos combustíveis à base de petróleo levou os EUA a buscar alternativas para produzir combustível renovável. Dessa forma, introduziram a biomassa vegetal através dos grãos de milho para a produção do etanol. Entretanto, foi diagnosticado que o etanol produzido a partir dos grãos de milho não seria suficiente para atender a demanda do país até 2030, visto que deveria produzir 30% de etanol através de recursos renováveis comparada à produção anual de combustível fóssil. Ficando evidente a necessidade de incluir novas fontes de biomassa facilmente disponível e tecnicamente viáveis (PERLACK; STOKES, 2011).

2.2 Etanol

A viabilidade do uso do etanol como combustível iniciou nos anos 70 com a crise do petróleo. O governo brasileiro incentivou a produção de álcool no intuito de substituir a gasolina através da criação do PROÁLCOOL – Programa de produção de álcool etílico em larga escala, oriundo da fermentação do caldo da cana-de-açúcar, melaço ou ambos. Os investidores na época receberam incentivos para produzir exclusivamente etanol. Como consequência, nos anos 80, o Brasil apresentou taxa de 85% de seus carros movidos a álcool. O álcool que era um subproduto do açúcar passou a ter destaque nas usinas, superando as produções de açúcar e aguardente (NETO, 2010).

O etanol tem se mostrado uma fonte alternativa de energia renovável em comparação aos combustíveis fósseis derivados do petróleo. O etanol é um combustível na forma líquida que sofreu varias adaptações em diferentes sistemas de abastecimentos até alcançar o setor de transporte. O que se sabe, é que a substituição dos combustíveis fósseis pelo etanol foi dada ao desenvolvimento de tecnologias acompanhadas do desenvolvimento social, além do que, acentuaram-se as preocupações com o meio ambiente e a emissão de gases do efeito estufa (RUBIN, 2008; LUBBE, 2012).

A produção de etanol pode ser suficiente para substituir a gasolina e consecutivamente reduzir a dependência de reservas de combustíveis fósseis, além de proteger o meio ambiente devido sua combustão mais limpa (GUPTA et al., 2011). Alguns países tem se destacado na produção de etanol lignocelulósico, temos como exemplo os Estados Unidos que produz etanol a partir da cultura de milho, e o Brasil através da cana-de-açúcar.

Os países desenvolvidos tem ganhado destaque por alocar recursos financeiros para implantar tecnologias modernas e eficientes na conversão de matérias lignocelulósicas em bioenergia através de distintos biocombustíveis, que vem ao longo dos tempos se tornando competitivos com os combustíveis de origem fósseis (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2007a).

Os biocombustíveis podem ser utilizados tanto na combustão direta para a produção de eletricidade, como combustíveis líquidos no setor de transporte, que é a forma mais comum e adotada nos Estados Unidos, Alemanha e França. A adoção do etanol como combustível está associada à capacidade de renovação, proporcionar sustentabilidade, ser produzido a partir de várias fontes lignocelulósicas, permitir o desenvolvimento regional a

partir de empregos industriais e rurais, auxiliar na redução de gases do efeito estufa e sua característica de biodegradabilidade (DEMIRBAS, 2007a; BALAT, 2009).

O etanol é o produto mais conhecido na família dos álcoois. Em sua estrutura molecular está presente um grupo hidroxila ligado a um átomo de carbono, e sua fórmula é conhecida como $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ou $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$. A utilização ocorre desde a produção de bebidas alcoólicas, solventes, aromatizante e combustível para veículos. É nomeado bioetanol quando é produzido através de produtos agrícolas (MOUCO, 2011). O etanol é o biocombustível mais utilizado para o transporte alternativo em todo o mundo e comercializado como etanol hidratado ou anidro, misturado à gasolina. Na Alemanha e França, o comércio desse combustível é registrado desde 1894 sendo consumido principalmente pelas indústrias de motores (DEMIRBAS; KARSLIOGLU, 2007b).

O etanol pode ser produzido a partir da cana-de-açúcar, milho e beterraba açúcareira variando nos índices de produtividade. No Brasil, o etanol é produzido por via fermentativa a partir da cana-de-açúcar com produtividade de 6,5 mil litros de etanol por hectare plantado. Em outros países como Estados Unidos a produtividade é de 4,2 mil litros de etanol de milho por hectare plantado e na Europa a produção chega a 5,5 mil litros de etanol de beterraba por hectare plantado (BRASKEM, 2015). Na União Europeia e China, o etanol é predominantemente produzido através do milho (JAY; GOVINDA, 2011).

A produção de etanol a partir da cana-de-açúcar tem expandido ocupando grandes proporções de áreas tropicais como o Brasil (ANDRADE e DINIZ, 2007). É importante discutir sustentabilidade da produção do sistema. A produção da cana-de-açúcar apresenta aspectos a serem questionados como o desmatamento e implantação de monocultura; a contaminação de águas superficiais, subterrânea e dos solos, pelo motivo do uso excessivo de adubos; a compactação do solo, devido ao tráfego de máquinas pesadas; o assoreamento de corpos d'água; a emissão de fuligem e gases do efeito estufa nas etapas de queima das palhas; as queimas descontroladas; o consumo excessivo de óleo diesel nas etapas de plantio, colheita e transporte (ANDRADE; DINIZ, 2007). Ao considerar os aspectos citados é necessário utilizar a biomassa lignocelulósica obtidas de outras culturas para a produção de bioetanol que acumulem menos aspectos negativos sobre a sustentabilidade do sistema de produção (DERMIBAS, 2011).

2.3 Etanol de primeira geração (E1G)

Culturas a base de sacarose e amido são consideradas matérias primas de primeira geração para a produção do etanol, na sequência, temos como exemplo a cana-de-açúcar no Brasil, e o milho nos Estados Unidos. Outras matérias primas enquadradas nesse cenário são as culturas de beterraba, sorgo doce, trigo, arroz e mandioca (PRASAD, SINGH & JOSHI 2007; SÁNCHEZ & CARDONA, 2008).

No Brasil, a produção de etanol de cana-de-açúcar é exclusivamente em tecnologias de primeira geração, uma vez que a sucrose presente no caldo da cana é fermentado para a produção de etanol. Essa forma de combustível teve grande aumento na sua produtividade nos últimos 29 anos, sendo uma taxa de 3,77% ao ano (CORTEZ, 2010).

O caldo de cana contém alto teor de açúcares redutores, dos quais não é necessário pré-tratamento como a hidrólise enzimática. No entanto, no Brasil o etanol é produzido a partir do melaço que é um subproduto da indústria açucareira. O melaço é rico em sacarose, mas as altas concentrações de sais minerais provocam o aumento da osmolaridade do meio de fermentação, ocasionando a inibição da fermentação (WACKETT, 2008).

As culturas a base de amido, em especial, o milho, carece de hidrólise enzimática para conversão do amido em açúcares fermentescíveis e esse recurso por sua vez, implica em gastos tornando o processo inviável em determinadas partes do mundo como, por exemplo, o Brasil, haja vista a produção de cana-de-açúcar ser significativamente difundida (HAHN-HAGERDAL et al., 2006).

Nos sistemas de bioenergia, a presença de um planejamento efetivo torna-se crucial em relação às culturas energéticas e principalmente na área agrícola destinada à plantação da biomassa, pois, devem-se considerar as espécies mais adequadas àquelas que consigam se adaptar e resistir às variações ambientais do local. Visto as novas práticas agrícolas, diferentes estudos tem conseguido demonstrar o potencial nos rendimentos de várias culturas energéticas (SÁNCHEZ, J. et al., 2012).

As fontes de biomassa ricas em sacarose ou armazenamento de polissacarídeos como o amido tem grande exploração para a produção de bioetanol. A biomassa lignocelulósica é uma fonte interessante por conter polissacarídeos estruturais que precisam ser convertidos em açúcares fermentescíveis, visto que esses constituintes são essenciais na etapa de

fermentação, por serem convertidos em etanol através das leveduras (CARDONA & SÁNCHEZ, 2007).

2.4 Etanol de segunda geração (E2G)

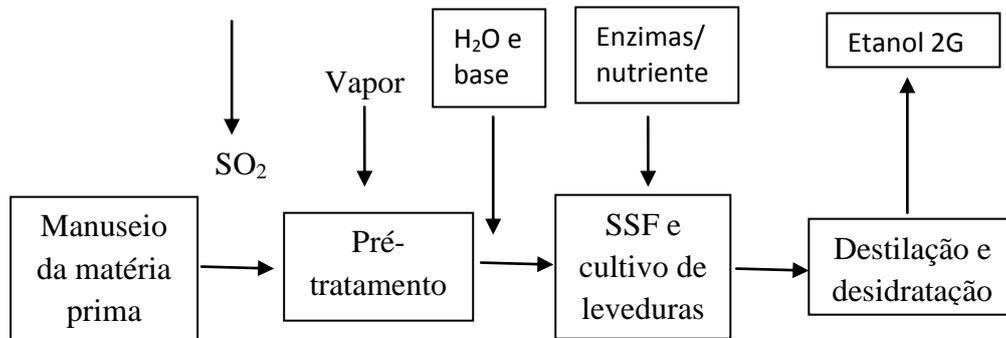
O etanol denominado de segunda geração (E2G) é o biocombustível produzido a partir de materiais lignocelulósicos como os resíduos agrícolas (palha do trigo ou milho e bagaço da cana-de-açúcar), resíduos florestais (pó e restos de serraria) além de culturas energéticas direcionadas a produção do E2G como é o caso do salgueiro e capim-elefante (CORTEZ, 2010).

A biomassa lignocelulósica é correspondente a 50% do total de biomassa disponível em todo mundo, sendo considerado o recurso renovável mais abundante da biosfera (CLAASSEN et al., 1999). A utilização e exploração de materiais lignocelulósicos salvaguardará a uso das terras agricultáveis para produção alimentos (CHAMPAGNE, 2007).

A produção do etanol através da biomassa lignocelulósica pode ser uma alternativa sustentável. A biomassa lignocelulósica aproveita parte dos insumos utilizados que foram desviados para a produção e manutenção de partes da planta que não são as matérias prima agrícola da cultura. Exemplificando a cultura do milho e da cana-de-açúcar, na qual o uso intensivo de fertilizantes e energia é desviado para produção de colmo e folhas (OHGREN et al., 2006; CARDONA & SÁNCHEZ, 2007). No processo de obtenção do etanol de segunda geração, as estratégias para a produção desse combustível têm como objetivo utilizar ambas as frações de celulose e hemicelulose da biomassa (SILVA, 2010).

O processo de conversão de materiais lignocelulósicos para a produção de E2G é complexo e requer etapas de hidrólise da hemicelulose, hidrólise da celulose, fermentação, separação da lignina, recuperação e concentração do etanol e tratamento da água residual. Os processos de hidrólise enzimática e fermentação são as opções mais promissoras para conversão dos carboidratos dos materiais lignocelulósicos em etanol (CORTEZ, 2010).

Figura 1 – Fluxograma esquemático da produção de etanol de segunda geração a partir de materiais lignocelulósicos.



Fonte: Adaptado de Cortez, 2010.

A produção em escala industrial de etanol de segunda geração (E2G) ainda é limitada em consequência do elevado custo no processamento da biomassa lignocelulósica, na obtenção de níveis suficientes de rendimento dos açúcares fermentescíveis e estratégia de fermentação eficiente. A hemicelulose presente na biomassa precisa ser convertida em pentose durante a fermentação para obter uma produção eficiente de etanol (GÍRIO, 2010). É necessário à redução de custos durante este processo para viabilizar a produção de E2G em escala industrial. As opções são melhorar o desempenho das enzimas durante o processo de hidrólise e o rendimento dos microrganismos durante a fermentação (ZHANG, 2008).

A produção sustentável de matéria prima em relação às unidades de processamento e seus produtos são importantes para viabilização do processo. A matéria-prima deve ser acessível e de fácil disponibilidade para que não haja interrupções operacionais pela falta de fornecimento de matéria-prima durante o processo, e, por conseguinte, não comprometa a questão econômica na fábrica de produção de bioetanol (APPA, 2007; FERNÁNDEZ, 2008).

O avanço tecnológico para a produção do etanol de segunda geração foi marcado com os recentes estudos sobre intercalação entre processos de tratamento da biomassa e fermentação. Os processos que após o pré-tratamento da biomassa conduzem a hidrólise da celulose separado da fermentação é conhecido como *Hidrólise e Fermentação Separada*, (PEREIRA Jr. et al., 2008); o processo que conduz a hidrólise enzimática e fermentação na mesma etapa é conhecida como *Sacarificação e Fermentação Simultânea* (TAHERZADEH;

KARIMI, 2007b). Há processos que conduzem a sacarificação e fermentação das pentoses e hexoses no mesmo reator denominados de Sacarificação e Co-fermentação Simultânea (TEIXEIRA et al., 2000).

As tecnologias para produção de etanol de segunda geração ainda estão em desenvolvimento, tornando os processos de produção com padronização mínima para alcançar um estágio comercial (HORTA, NOGUEIRA 2008). Entretanto, existe uma corrida tecnológica industrial para o desenvolvimento de rotas de conversão mais produtivas, destacando-se aquelas capazes de utilizar resíduos lignocelulósicos para a produção de etanol e as que gerem combustíveis com maior conteúdo energético a partir de matérias-primas lignocelulósicas (NYKO et al., 2014).

A principal meta é a total disponibilização dos açúcares presentes na celulose e hemicelulose para os microrganismos da fermentação sendo fundamental para que a produção do etanol lignocelulósico se torne economicamente competitivo como o produzido a partir do amido e cana-de-açúcar (HAHN-HAGERDAL et al., 2007).

A otimização dos processos de caracterização química da biomassa, dos pré-tratamentos e da sacarificação tornou possível produzir biocombustíveis através de várias matérias primas como o milho, beterraba e mandioca. No entanto, a produção de bioetanol a partir dessas culturas alimentares tem encontrado resistência no uso pelo fato de competir com os alimentos, causando a redução na produção e aumento dos preços (EISENTRAUT, 2010). A busca por culturas energética sustentáveis é norteadas pelos princípios de não ser alimentícia, ser todas utilizadas no processo, não ser exigente no uso de insumos, não competir em área de cultivo com lavouras alimentícias e está adaptada para a limitação de áreas de cultivo imposta pelo aquecimento global. A palma forrageira neste contexto se apresenta como uma candidata que preenche os requisitos em sua maioria. A cultura também está adaptada ao cultivo não sendo limitante o conhecimento técnico para condução da lavoura.

2.5 *Opuntia ficus-indica* Mill

A palma forrageira pertence à Divisão Embryophyta, sub-divisão Angiosperma, da Classe: Dicotyledoneae, sub-classe: Archiclamiidae, na Ordem das Opuntiales e família das cactáceas. Sabe-se da existência de 178 gêneros dessa família, sendo 2.000 espécies

conhecidas (SILVA e SANTOS, 2007). Data-se a introdução da *Opuntia ficus-indica* Mill no Brasil no século XIX, sendo inicialmente utilizada como abrigo da Cochonilha (*Dactylopius coccus*), oriundo do México, inseto produtor de corante utilizado para o preparo de sobremesas, bebidas, roupas, chás, etc. (ARAUJO, 2004).

A palma forrageira *Opuntia ficus-indica* Mill é uma cultura de grande importância agrícola em regiões áridas ao redor do mundo (SÁNCHEZ, 2012 *Apud* GRIFFITH, 2004). O cultivo do gênero *Opuntia* em regiões áridas e semiáridas está relacionado à capacidade de permanecer com produção de biomassa viável em regiões com o clima semiárido e períodos de seca (AYALA, 2008). A *Opuntia ficus-indica* apresenta caule pouco ramificado com cladódio que pode chegar a pesar 1kg e medir 50 cm de comprimento. O cladódio é um caule modificado que possui uma forma oval-elíptica, cor verde-fosco e nos quais surgem flores amarelo-brilhando e roxa, quando madura (SILVA e SANTOS, 2007).

No Brasil, a área de cultivo da palma forrageira alcança mais do que 500 mil hectares sendo mais predominante na região do Nordeste entre os Estados de Alagoas e Pernambuco (LEITE, 2006; MOURA et al., 2011). Fisiologicamente, esta planta apresentou-se adaptada as zonas áridas e semiáridas em razão da sua cutícula impermeável, menor número de estômatos que reduz a perda de água por evapotranspiração e ao aparelho fotossintético do tipo CAM (metabolismo do ácido das crassuláceas). Capaz de captar energia solar durante o dia e fixar o CO₂ à noite (RAMOS et al., 2011). Sabe-se que a sua eficiência no uso da água é 10 vezes maior comparada às outras plantas (LIRA et al., 2005).

No Brasil, o Estado de Pernambuco foi o primeiro do Nordeste a introduzir e pesquisar a palma forrageira com foco para alimentação animal. O interesse em pesquisar a palma forrageira do gênero *Opuntia* vindo sendo motivado devido ao contexto da bioenergia (KULOYO, 2012; GINESTRA et al., 2009; SILVA e SANTOS, 2007), haja vista as crescentes preocupações com o esgotamento das energias de natureza fóssil, emissões de gases, o desenvolvimento rural e a busca por alternativas na matriz energética, visando à produção de energia renovável (EU, 2009). Os frutos da palma também representam uma promissora matéria-prima para a produção de etanol, dada sua composição (Tabela 1), grande quantidade de açúcares solúveis (6-14%) na matéria fresca (DURU & TURKER, 2005) e baixa percentagem de lignina < 0,1 na matéria seca (AL-KOSSORI, 1998). Os cladódios são descritos com um teor de carboidratos entre os valores de 25% e 50% de sua matéria seca

total (VIEIRA et al., 2008; LEAL, 2009; SILVA et al., 2010), 64% a 71% para cada 100g da biomassa seca (STINTZING; CARLE, 2005).

Tabela 1 – Composição média dos cladódios da *Opuntia ficus-indica* Mill demonstrando a quantidade de seus constituintes na biomassa *in natura* e seca.

Constituintes	Peso fresco (g/100g)	Peso seco (g/100g)
Água	88-95	0
Carboidratos	3-7	64-71
Cinzas	1-2	19-23
Fibra bruta	1-2	18
Proteínas	0,5-1	4-10
Lipídeos	0,2	1-4

Fonte: Adaptado de STINTZING; CARLE, 2005.

2.6 Composição da biomassa lignocelulósica

A parede celular das plantas consiste principalmente de três polímeros nomeados celulose, hemicelulose, lignina e dependendo da biomassa, a pectina também pode está presente (VAN MARIS et al., 2006). A composição da biomassa lignocelulósica é variável (Tabela 2) entre e dentro do tipo de cada biomassa, o que torna necessário a determinação dos constituintes da biomassa em estudo.

Tabela 2 – Porcentagem geral da composição dos polímeros e seus monômeros que constituem a biomassa lignocelulósica.

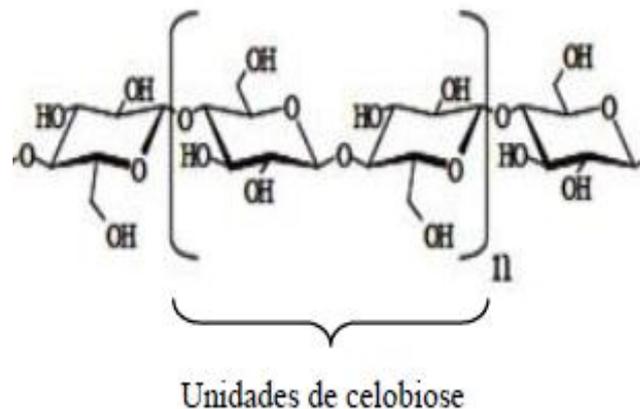
Polímeros	Lignocelulose (%)	Monômeros
Celulose	33-51	Glicose
Hemicelulose	19-34	Xilose, glicose, manose, arabinose, ranose, galactose
Lignina	20-30	Álcoois aromáticos
Pectina (quando presente)	2-20	Ácido galacturônico e ranose

Fonte: Adaptado de VAN MARIS et al., 2006.

Na avaliação do potencial biomassa lignocelulósica para produção de etanol, há um maior interesse dado à celulose que está relacionado com a quantidade presente de glicose em sua composição. As etapas de pré-tratamento e hidrólise são essenciais para conversão da celulose

em açúcares fermentescíveis e, por conseguinte, torna-los disponíveis para os microrganismos fermentativos na etapa de fermentação na produção do bioetanol. A celulose apresenta regiões ordenadas com unidades repetitivas de celobiose, e por essa razão (Figura 2), é considerado como um homopolissacarídeo (SANTOS et al., 2012). A estrutura apresenta-se sob a forma de uma cadeia linear homopolissacarídica formada entre 2 000 a 15 000 unidades de D-glicose ligadas por β -(1 \rightarrow 4) – glicosídicas (VAN MARIS et al., 2006; KUMAR; SINGH & SINGH, 2008;).

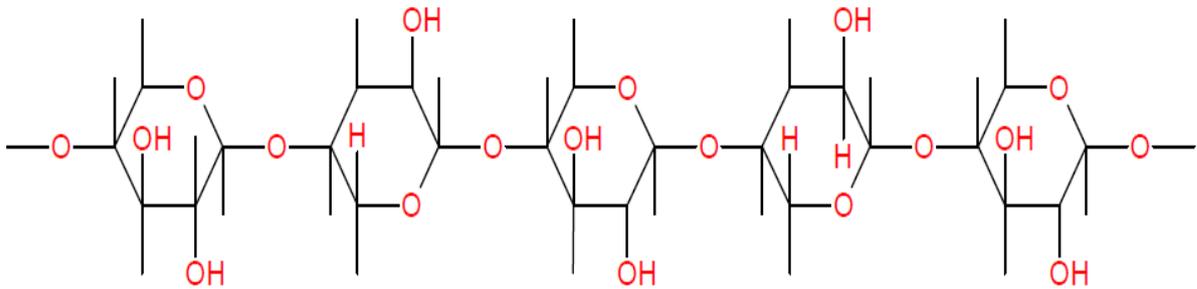
Figura 2 – Regiões ordenadas demonstrando as repetições das unidades de celobiose através de ligações β -glicosídicas.



Fonte: TÍMÁR-BALÁZSY; EASTOP, 1998.

A hemicelulose é um polímero formado por monômeros de pentose (xilose, arabinose) e hexoses (manose, glicose, galactose) e ácidos urônico (ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico). As ligações presentes nesses açúcares são do tipo β -1,4-glicosídica ou β -1,3-glicosídica (Figura 3). O polímero de hemicelulose é facilmente hidrolisado em monossacarídeos quando comparado à celulose, por ser estruturalmente mais ramificado tornando-o mais susceptível à hidrólise ácida por oferecer mais acesso aos ácidos orgânicos (PÉREZ et al., 2002; VAN MARIS et al., 2006; CANILHA et al., 2010). A cadeia da hemicelulose é contínua (Figura 3), sendo formada por uma unidade de xilana, de duas ou de mais unidades como, por exemplo, as glucomanana unidas entre si por ligações de hidrogênio (ALVES, 2011).

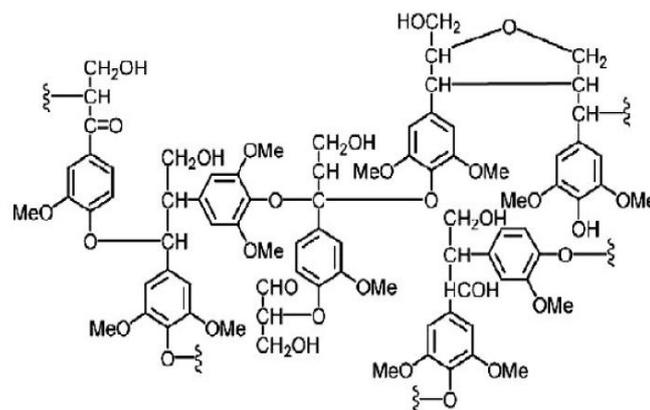
Figura 3 – Estrutura parcial das hemiceluloses demonstrando as Pontes de hidrogênio entre as unidades de xilana.



Fonte: ALVES, 2011.

As ligações de hidrogênio presentes na hemicelulose juntamente com a celulose são responsáveis pela síntese das microfibrilas, estruturas essas que constituem a espinha dorsal da parede celular do vegetal. A composição da hemicelulose pode variar de acordo com cada espécie de vegetal (VAN MARIS et al., 2006; KUMAR et al., 2008).

Figura 4 – Estrutura geral da Lignina apresentando os principais tipos de ligações entre as unidades fenilpropanóides e seus resíduos fenólicos.



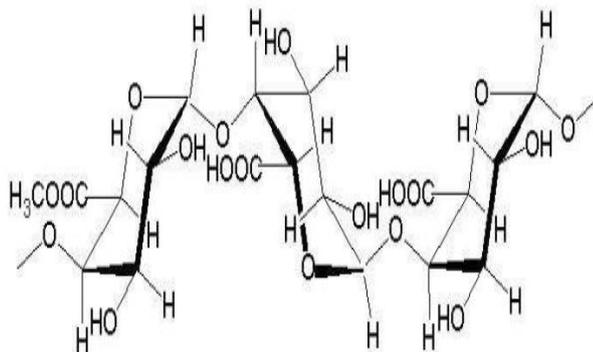
Fonte: CHANG, 2007.

A lignina compõe cerca de 20-30% da biomassa lignocelulósica (Tabela-2) e sua composição consiste de resíduos fenólicos (Figura 4; MARIS et al., 2006; KUMAR et al.,

2008). A lignina presente na parede vegetal possui função estrutural conferindo impermeabilidade, resistência microbiana e resistência ao estresse oxidativo (MOSIER et al., 2005). A lignina é uma macromolécula que aumenta significativamente a resistência mecânica das plantas, dada a sua relação com as microfibrilas da celulose (FENGEL; WEGENER, 1989). A lignina funciona como uma barreira física impedindo o acesso das enzimas utilizadas no ataque da celulose. Reduzindo o aproveitamento na etapa de hidrólise. (RUEGGER; TAU-K-TORNISIELO, 2004).

A pectina é um polissacarídeo de estrutura complexa que quando presente nos vegetais fortalece a matriz de celulose da parede celular do vegetal (VAN MARIS et al., 2006). O polímero de pectina é constituído por uma cadeia de subunidades de α -D-galacturônico ligados por (1 \rightarrow 4) ligações glicosídicas (Figura 5).

Figura 5 – Ilustração esquemática da estrutura química da pectina mostrando resíduos de ácido urônico e grupos metilados.



Fonte: BENHURA; CHIDEWE, 2011.

Na pectina os açúcares como D-galactose, L-arabinose e D-xilose podem estar presentes através de ligações nas cadeias laterais. Outros açúcares constituintes como D-glicose, D-manose, L-fucose e ácido D-glucurônico também estão presentes no polímero de pectina, porém em menores quantidades (GOYCOOLEAL; CÁRDENAS, 2003). Os polímeros de pectina são geralmente encontrados em grandes quantidades nos resíduos agrícolas como nas cascas de frutas cítricas (VAN MARIS et al., 2006).

A existência de compostos orgânicos e inorgânicos presentes nos materiais lignocelulósicos como os ácidos graxos, ésteres, álcoois e hidrocarbonetos promovem

inúmeras características as plantas e são encontrados em diversas quantidades de acordo com a espécie, idade e região (ANNUNCIADO, 2005). Compostos inorgânicos podem variar entre 1 a 10% nos materiais lignocelulósicos e são conhecidos como cinzas, que são formados por sulfatos, oxalatos, carbonatos, silicatos de cálcio, potássio, magnésio e outros sais (BIANCHI, 1995).

Os extrativos (materiais solúveis) estão presentes na biomassa, entretanto, não fazem parte da estrutura celular, como por exemplo, açúcares não estruturais, materiais nitrogenados, clorofila e ceras. Os extrativos podem ser extraídos utilizando-se solventes polares e não polares, e são nomeados de acordo com o tipo de solvente utilizado (KUMMAR; WYMAN, 2009).

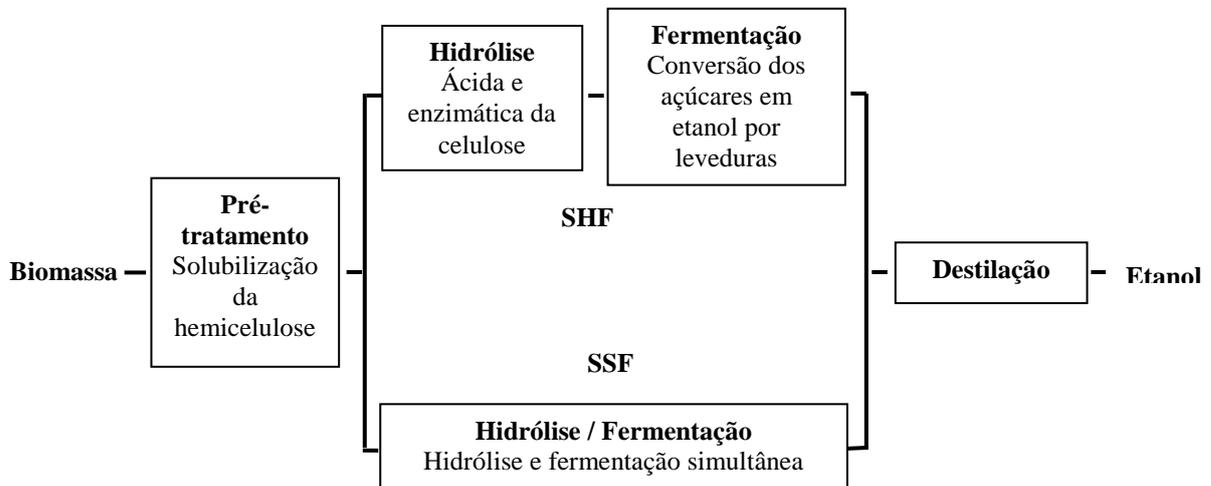
Na produção de etanol de segunda geração (E2G), o processo de conversão do material lignocelulósico em álcool requer três etapas: (1) pré-tratamento, cujo objetivo é liberar os polímeros de celulose e hemicelulose dos complexos de lignina, (2) despolimerização dos carboidratos em açúcares livres através da etapa de hidrólise enzimática (sacarificação), (3) fermentação dos açúcares hexoses e pentoses para produção do etanol (CASTRO; PEREIRA, 2010).

2.7 PRÉ-TRATAMENTOS

2.7.1 Etapas de pré-tratamento

A caracterização da composição química da biomassa é fundamental para orientar na escolha do pré-tratamento, visto que cada tipo de matéria-prima requer tratamento específico (KULOYO, 2012). O pré-tratamento é um processo de solubilização e separação de um ou mais componentes da biomassa, devido a esta natureza, ainda é um grande desafio para a produção de etanol de segunda geração (Figura – 6). Devido ao grau de complexidade envolvido na estrutura e composição da parede celular da planta, a liberação dos açúcares presentes na celulose e hemicelulose requerem processos que levam ao aumento nos custos na produção de etanol lignocelulósico (Figura 7). As etapas envolvidas na conversão dos açúcares em etanol são: a) pré-tratamento, b) hidrólise enzimática, c) fermentação do hidrolisado seja por bactérias, leveduras ou fungos filamentosos (BALAT; BALAT, 2009).

Figura 6 – Ilustração esquemática do processo designado à produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica. SHF: hidrólise e fermentação separada; SSF: sacarificação e fermentação simultânea.



Fonte: Adaptado de HAHN-HAGERDAL et al., 2007a.

O processo de fermentação da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol requer a realização de duas etapas prévias, a hidrólise ácida e a enzimática. Os açúcares liberados pela digestão enzimática serão utilizados pelas leveduras. As etapas de hidrólise e fermentação quando acontecem de forma separada é nomeada *SHF*, *Sacarificação e Fermentação separada*. As etapas podem ser conduzidas de forma sinérgica e são configuradas como sacarificação e fermentação simultâneas – *SSF*. (Figura-6). O etanol produzido é recuperado pelo processo de destilação do caldo fermentado (OHGREN et al., 2007; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

A almejar a eficiência dos pré-tratamentos é importante por que melhoram na formação e disponibilização dos açúcares, evita a degradação e perda de hidratos de carbono, diminuem a formação de inibidores no processo de fermentação promovendo um consumo baixo de energia e gastos operacionais (TAHERZADEH; KARIME, 2008; KUMAR et al., 2009). Estudos têm apontado às etapas de pré-tratamentos da biomassa como as mais onerosas para a produção do etanol. No entanto, com a difusão do etanol lignocelulósico, estima-se alcançar melhorias na eficiência e redução de custos nos métodos de pré-tratamentos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos (GALBE; ZACCHI, 2007; KUMAR et al., 2009).

O desenvolvimento de um pré-tratamento considerado ideal, ainda é um desafio a ser ultrapassado, principalmente se considerarmos a eficiência de hidrólise e fermentação na conversão dos carboidratos a etanol, pois, a biomassa possui uma grande diversidade (ALVIRA et al., 2010). Os procedimentos de pré-tratamento desenvolvidos abordam princípios físicos, químicos e bioquímicos (biológicos).

2.7.2 Pré-tratamento por fragmentação

Procedimentos como trituração, moagem e quebra em lascas da biomassa levam a diminuição do tamanho dos materiais lignocelulósicos e consecutivamente o aumento da área superficial específica e redução da cristalinidade da celulose, dessa forma, a hidrólise ocorre de maneira eficiente. (SUN; CHENG, 2002). Uma ou mais dessas etapas realizadas promovem a redução das limitações de transferência de calor e de massa. A biomassa quando quebrada em lascas podem variar de 10 a 30 mm, 0,2 a 2 mm na moagem (KUMMAR; WYMAN, 2009).

2.7.3 Pré-tratamento físico

Os pré-tratamentos físicos envolvem vários métodos mecânicos e não mecânicos comumente utilizados na biomassa potencial (Tabela 3). A energia gasta nessa etapa irá depender das características finais do tamanho das partículas da biomassa residual (KUMAR et al., 2009). Para os métodos não-mecânicos, foi realizado teste de irradiação com raios gama na celulose, e observou-se clivagem das ligações β -1,4-glicosídicas. No entanto, esse método é inviável para um processo em grande escala por restar dúvidas sobre sua viabilidade econômica (GALBE; ZACCHI, 2007; KUMAR et al., 2009).

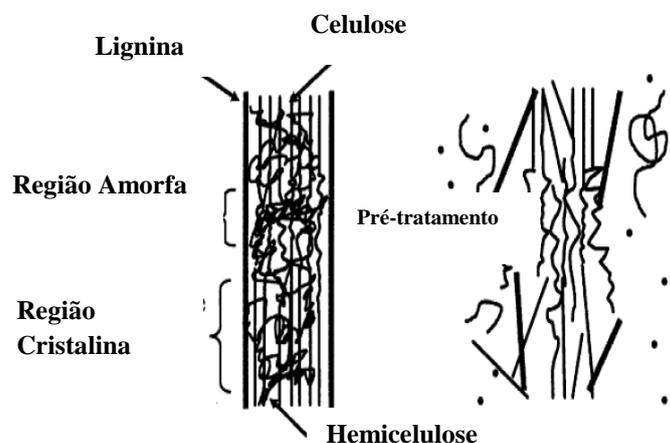
Tabela 3 – Vantagens e desvantagens do método de pré-tratamento físico.

Método de pré-tratamento	Processo de pré-tratamento	Vantagens	Limitações e desvantagens
	Mecânico: Fragmentação	Reduz a cristalinidade da celulose e aumenta a superfície da biomassa	A energia necessária é geralmente superior a inerente da biomassa
Pré-tratamento físico	Pirólise	Produção de gás e produtos líquidos	Requer altas temperaturas; formação de cinzas
	Ozonólise	Reduz o teor de lignina; não produz substâncias tóxicas	Custo elevado; requer grandes quantidades de ozônio

Fonte: Adaptado de Kuloyo, 2012.

A importância dos pré-tratamentos no processo de produção do Etanol 2G motiva a abordagem de tecnologias consecutivas como os pré-tratamentos físicos, ácidos e hidrólise enzimática, cuja função é promover a desestruturação dos polímeros de celulose, hemicelulose e lignina (Figura-7) (GRAY et al., 2006; GUPTA et al., 2009; ROLLIN et al., 2011).

Figura 7 – Polímeros de celulose, hemicelulose e Lignina sendo desestruturados com o efeito do pré-tratamento sobre a biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de MOSIER et al., 2005.

Os pré-tratamentos são condições necessárias para viabilizar a biomassa lignocelulósica, uma vez que esse processo irá aumentar a superfície de substratos para serem assimilados através das enzimas, visto a degradação da celulose e conseqüentemente disponibilização dos açúcares fermentescíveis para os microrganismos fermentadores (ALVIRA, P. et al., 2010).

2.7.4 Pré-tratamento químico e formação de substâncias inibidoras.

Nos processos de pré-tratamentos químicos da biomassa lignocelulósica surgem os inibidores microbianos que são limitantes do processo (Tabela 4). A geração de inibidores afeta diretamente a economia do rendimento de bioetanol produzido. Várias estratégias de destoxicação dos hidrolisados hemicelulósicos foram desenvolvidos para remoção dos inibidores e melhorar o desempenho fermentativo (GUPTA, SHARMA & KUHAD, 2009; KUHAD, R. C. et al, 2010).

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens do método de pré-tratamento químico.

Método de pré-tratamento	Processo de pré-tratamento	Vantagens	Limitações e desvantagens
Pré-tratamento químico	Ácido diluído	Hidrolisa hemicelulose a xilose e outros açúcares; altera estrutura da lignina	Alto custo; corrosão de equipamentos; formação de inibidores
	Alcalino	Remove hemicelulose e lignina; aumenta a área de superfície da biomassa	Longo tempo de residência; sais formados são irrecuperáveis
	Peróxido de hidrogênio	Solubilização da lignina; não produz inibidores	Decompõe-se em altas temperaturas;
	Organosolv	Hidrolisa a lignina e hemicelulose	Alto custo; solventes precisam ser recuperados e reciclados

Fonte: Adaptado de Kuloyo, 2012

Os agentes inibidores são gerados nas etapas de degradação dos açúcares. No processo as substâncias tóxicas são geradas a partir de compostos aromáticos derivados de furano, tendo mais importância à classe do furfural que surge a partir das pentoses e o hidroximetil furfural (HMF) que é gerado a partir das hexoses. Os furanos são formados em altas concentrações durante as etapas graves de pré-tratamento ácido, como aquelas sob altas concentrações de ácido e maior tempo de pré-tratamento (TAHERZADEH et al., 1997; KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004).

O Furfural e o HMF são passíveis de serem convertidos em álcool furfúrico e álcool 5-hidroximetil furfúrico sob a ação de leveduras do gênero *Saccharomyces*. No entanto, esses compostos quando presentes são responsáveis por maior taxa de retardamento do crescimento da levedura quando comparados com a concentração de etanol na fermentação (PALMQVIST; HAHNHAGERDAL, 2006b).

Na hidrólise lignocelulósica a inibição celular causada pela presença de furfural e HMF é dependente de NADH desidrogenase alcoólica da levedura (ADH), e que esse processo leva ao acúmulo intracelular do acetaldeído e como consequência, latência no crescimento microbiano (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000b; MODIG; LIDÉN; TAHERZADEH, 2002). A acidificação provocada no citoplasma da levedura compromete a integridade da membrana celular e pode apresentar efeitos tóxicos ocasionando a morte dos organismos fermentadores (VAN MARIS et al., 2006).

A desintoxicação do hidrolisado pode ser realizada antes da fermentação com métodos físicos, químicos e biológicos (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000a). Os procedimentos utilizam arrastamento com vapor, carvão ativado, extração com solventes orgânicos e peneiras moleculares (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996).

O procedimento desintoxicante mais utilizado é adição de hidróxido de cálcio no hidrolisado para remoção de compostos fenólicos e furaldeídos (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Nesse processo, o pH do hidrolisado é alterado até pH 10 com adição de Ca(OH)_2 ou outro hidróxido. Nessa reação, ocorre a formação de um precipitado desses contaminantes que logo em seguida é removido. No final do processo, o pH do hidrolisado é novamente reajustado para o pH 5,5 com ácido H_2SO_4 (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996; PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000a).

A eficácia de cada método de desintoxicação é dependente do pré-tratamento da matéria-prima. O tipo de pré-tratamento influencia a qualidade do hidrolisado lignocelulósico através dos diferentes níveis de toxicidade (CARVALHO et al., 2006). Os pré-tratamentos químicos geram custos devido a corrosão dos reatores. Os custos surgem pela necessidade de construir reatores não corrosivos que funcionam em altas pressões. Essas medidas tornam o pré-tratamento com ácido diluído mais caro em comparação ao de explosão de vapor (KUMAR et al., 2009).

Outra alternativa para eliminar a presença de inibidores no hidrolisado é o desenvolvimento de cepas tolerantes a esses agentes através de modificações genéticas e engenharia metabólica. No entanto, as pesquisas ainda são incipiente. Necessitando conhecer mais sobre a natureza das resistências dos microrganismos fermentadores aos inibidores (VAN MARIS et al., 2006; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

2.7.5 Pré-tratamento biológico

Os processos de pré-tratamento biológico geralmente são empregados para a produção de E2G, e utilizam para essa etapa, microrganismos capazes de degradar a lignina e hemicelulose através da ação de enzimas liberadas sobre os materiais lignocelulósicos, temos como exemplo, as enzimas peroxidases e lacase produzidas por fungos da podridão-branca (KULOYO, 2014).

No pré-tratamento biológico acontece à deslignificação fúngica sobre a biomassa, fazendo com que a lignina e hemicelulose sejam degradadas com baixo gasto de energia. (KULOYO, 2012). Nesta etapa de pré-tratamento não é necessário energia durante o processo e nem gastos com produtos químicos para degradação dos polímeros do material lignocelulósico, além da vantagem de poder ser realizado em baixas temperaturas. Porém, a taxa de degradação ocorre mais lenta, tornando-se necessário incorporá-lo com outros métodos de pré-tratamento (HSU, 1996; GALBE; ZACCHI, 2007).

2.8 HIDRÓLISE

2.8.1 Hidrólise Ácida

A conversão da celulose em glicose através do processo de hidrólise é nomeada sacarificação, e essa etapa consiste em quebra de ligações glicosídicas, onde são originados os monômeros de glicose que posteriormente serão fermentados a etanol. O processo pode ocorrer de duas maneiras, através do método químico utilizando ácido, ou enzimático (CARMO, 2013).

Na etapa de hidrólise química, o que se utiliza é um ácido nos materiais lignocelulósicos geralmente em temperatura específica e tempo controlado, e é a partir deste processo que surgem os monômeros de açúcares oriundos da celulose e hemicelulose. Para essa metodologia tem-se descrito na literatura a utilização do ácido sulfúrico (H_2SO_4) sob a forma concentrada ou diluída em concentrações menores que 1,0% (TAHERZADEH; KARIMI, 2007a). Dessa maneira, é possível encontrar boas taxas de hidrólise da celulose (OGEDA; PETRI, 2010). Desse método químico, o inconveniente é a formação de inibidores como o 5-hidroximetilfurural (TAHERZADEH; KARIMI, 2007a).

2.8.2 Hidrólise enzimática

As etapas de hidrólise enzimática da biomassa ocorrem com o emprego de celulasas capazes de converter a celulose em açúcares fermentescíveis, por essa razão, são consideradas biocatalisadores de alta especificidade. A glicose é nomeadamente o açúcar de maior interesse industrial para produção de etanol (CASTRO; PEREIRA, 2010).

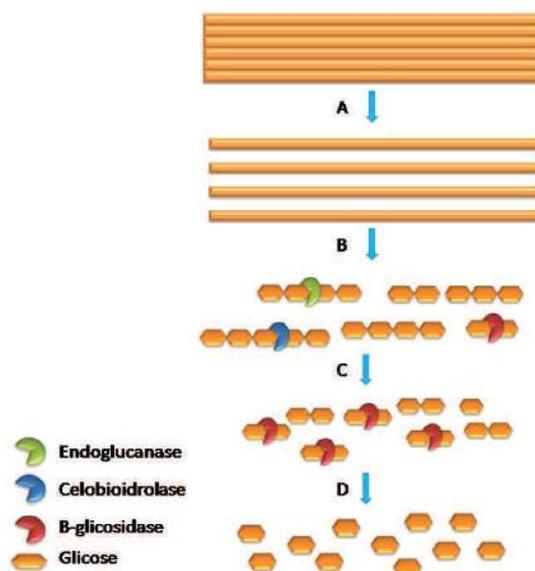
No processo de hidrólise enzimática da celulose ocorre adsorção da celulase em sua superfície, por conseguinte, biodegradação da celulose em açúcares fermentescíveis e por último, dessorção da enzima celulase (TAHERZADEH; KARIMI, 2007b).

As enzimas mais convenientes no processo de hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica são as celulasas, essas por sua vez, podem ser encontradas sob três tipos: endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase. Os biocatalisadores no processo de hidrólise possuem papel de destaque na conversão da celulose em glicose, uma vez que tornam a superfície da celulose mais acessível umas as outras enzimas (QUILHÓ, 2011).

As enzimas do tipo endoglucanases (endo-1,4- β -glucanases) iniciam o processo de hidrólise do material lignocelulósico, uma vez que hidrolisam ligações internas do tipo β -1,4 (Figura - 8). O sítio de ação são as regiões amorfas e reduzem a polimerização do substrato (CASTRO; PEREIRA, 2010). A ação das endoglucanases expõem as microfibrilas presentes na celulose, tornando-as susceptíveis as outras enzimas, além disso, fazem com que ocorra o aumento dos oligossacarídeos que serão mais tarde expostos a ação das exoglucanases (ARO; PAKULA. PENTILLA, 2005).

As exoglucanases (celobioidrolase ou exo-1,4- β -D-glucanases) degradam as cadeias de açúcar, visto sua remoção das unidades de celobiose (dímeros de glicose) (TAHERZADEH; KARIMI, 2007b). As β -glicosidases (β -glicosídeo, gluco-hidrolase ou celobiase) fazem parte do último repertório do complexo enzimático das celulases que hidrolisam a celobiose e os oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO; PEREIRA, 2010).

Figura 8 - Sistema de ação enzimática envolvendo a degradação através do processo de despolimerização do polímero de celulose. a) Afrouxamento da rede fibrosa; b) Formação de fragmentos de celulose; c) Digestão enzimática da celulose; d) Quebra da celulose em celobiose.



Fonte: Arantes e Saddler, 2010.

O início do mecanismo de hidrólise da celulose (Figura – 8) ocorre no momento em que as celulases são adsorvidas na superfície insolúvel da célula, e como consequência, inicia o processo de afrouxamento da rede fibrosa da celulose (Figura – 8, A). O próximo passo é a formação de fragmentos de celulose dando origem aos oligossacarídeos solúveis sob influência das endoglucanases e exoglucanases (B) e celobiose (C). As β -glicosidade finalizam o processo quebrando a celulose em celobiose (Figura – 8, D; ARANTES; SADDLER, 2010).

A hidrólise da hemicelulose deve ser eficiente, uma vez que contribuirá significativamente para um bom desempenho da hidrólise da celulose (GARCÍA-APARÍCIO, 2007). Há a necessidade de um maior número de enzimas para degradar a hemicelulose devido a sua variada composição. As enzimas que despolimerizam, ou seja, que revertem polímeros a monómeros e as que removem os grupos substituintes são as mais importantes (DYK; PLETSCHEKE, 2012). Outra enzima necessária ao processo é a xilanase (polímeros de xilose). A xilanase é capaz de hidrolisar a xilana em xilose, causando a degradação da hemicelulose produzindo xilooligômeros e xilose (GARCÍA-APARÍCIO, 2007).

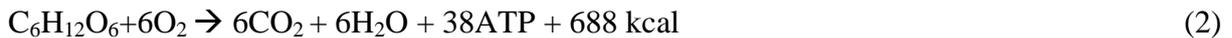
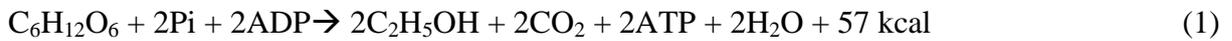
2.9 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOETANOL

2.9.1 Fungos

No processo fermentativo, os microrganismos comumente utilizados são as leveduras por serem de fácil cultivo e baixa exigência nutricional. As leveduras são seres unicelulares que se reproduzem por brotamento ou gemulação, mitose. A reprodução na forma sexuada ocorre por meiose formando esporos haploides (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). Quanto ao metabolismo energético podem ser aeróbios, aeróbios facultativos e fermentadores. (LANE; MORRISSEY, 2010).

A *Saccharomyces cerevisiae* e a *Kluyveromyces marxianus* apresentam um metabolismo aeróbio facultativo. Quando essas leveduras estão em meio anaeróbico, enzimas piruvato-decarboxilase e álcool desidrogenase são ativadas para produção de etanol e água a partir do piruvato (equação de Gay-Lussac, Equação 1). No entanto, quando na presença de oxigênio, o ácido pirúvico parcialmente é transferido para o ciclo do ácido tricarbóxico (ciclo de Krebs)

(Equação 2), que por conseguinte, será oxidado a dióxido de carbono e água dentro da mitocôndria (LANE; MORRISSEY, 2010).



Gay-Lussac propôs uma equação para determinar o rendimento estequiométrico teórico da produção de etanol a partir da glicose (Equação 3).

$$\eta = \frac{92 \text{ g de etanol}}{180 \text{ g de glicose}} = 0,511 \text{ g de etanol. g de glicose}^{-1} \quad (3)$$

Na fermentação ocorre a degradação da glicose e outros nutrientes orgânicos em vários produtos que são característicos para os diferentes organismos, para geração de energia sob a forma de adenosina trifosfato, ou ATP (LEHNINGER et al., 2006).

A glicose possui um papel de destaque no metabolismo da maioria dos microrganismos. Sua oxidação se dá através da glicólise, processo pelo qual é desencadeado por uma sequência de dez reações realizadas por enzimas glicolíticas originando duas moléculas de piruvato. As moléculas de piruvato podem ser utilizadas por microrganismos aeróbicos que as convertem por oxidação em CO_2 , H_2O e ATP (ciclo de Krebs). Os microrganismos anaeróbicos reduzem o lactato (via de fermentação do ácido láctico), ou etanol, CO_2 e ATP (via de fermentação alcoólica) (LEHNINGER et al., 2006).

2.9.2 *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* tem sido historicamente utilizada no processo de fermentação de matérias-primas a base de açúcar e amido, e, recentemente se tornou um microrganismo preferido na fermentação do hidrolisado da biomassa lignocelulósica para produção de etanol. Sua escolha nesses processos tem sido diagnosticada por sua capacidade de produzir bons rendimentos de etanol, ser tolerante ao etanol produzido, haja vista ser uma substância tóxica

a levedura, amplo espectro contra os inibidores, e elevada pressão osmótica (HAHN-HAGERDAL et al., 2007a). A adaptação eficiente ao etanol foi resultado de milhares de anos de seleção pelo homem para produção de alimentos (OLSSON; HAHN-HAGERDAL et al., 1996; PISKUR et al., 2006; WACKETT, 2008).

O emprego da *S. cerevisiae* na fermentação de biomassa lignocelulósica ainda é passível de desafios no campo da engenharia metabólica, visto sua incapacidade de fermentar açúcares como a xilose e arabinose (KUYPER et al., 2005b). O fato pelo qual leveduras *S. cerevisiae* não consigam utilizar a xilose mesmo apresentando naturalmente genes para esse feito, é dado ao baixo nível de expressão gênica, que termina por ser um mecanismo insuficiente nesse processo (TOIVARI et al., 2004).

Outras candidatas como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus* conseguem utilizar as pentoses. No entanto, ensaios de fermentação para produção de etanol a partir de glicose perceberam que essas cepas produzem cinco vezes menos etanol em comparação a *Saccharomyces cerevisiae*, e requerem maior controle de aeração. Além disso, apresentam baixa tolerância ao etanol produzido (CLAASEN et al., 1999).

2.9.3 *Kluyveromyces marxianus*

A levedura *Kluyveromyces marxianus* é ideal para produção de etanol a partir de resíduos de alimentos e sólidos como o bagaço de cana-de-açúcar, uma vez que esses microrganismos de maneira eficiente convertem substratos da biomassa por apresentarem-se tolerantes à alta temperatura (COSTA, 2011).

A espécie *Kluyveromyces marxianus* é um microrganismo unicelular da classe dos hemiascomicetos, que possui núcleo, sem motilidade e homotático (LANE e MORRISSEY, 2010). Classificada inicialmente como *Saccharomyces marxianus*, em homenagem a Marx, pesquisador que a isolou pela primeira vez a partir de uvas (FONSECA et al., 2008).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* é um microrganismo aeróbio facultativo que obtém energia através do ciclo do ácido tricarbóxico ou pela fermentação etanólica. Sendo uma espécie respiro-fermentativa, essa levedura consegue realizar simultaneamente fermentação e respiração. O que acontece no metabolismo da *Kluyveromyces marxianus* na presença de altas concentrações de açúcar é o direcionamento desse carboidrato para o ciclo do ácido

tricarboxílico e a geração de energia. Mecanismo esse contrário nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, que quando presente em altas concentrações de açúcar, é fortemente induzida para via de fermentação uma vez que essa espécie utiliza piruvato para produção de etanol (LANE; MORRISSEY, 2010).

As leveduras *K. marxianus* crescem em numa variedade de substratos, são capazes de crescer em até 52° C, assimilam açúcares essenciais com lactose e a inulina, tem taxa de crescimento rápido e alta capacidade secretora (FOSENCA et al., 2008; LANE; MORRISSEY, 2010). A espécie *K. marxianus* é utilizada para a produção de enzimas como as β -galactosidase, β -glicosidase, poligalacturonases, β -xilosidade e celulase. Enzimas utilizadas na industrial alimentícia humana e animal para redução de lactose em alimentos, e produção de etanol (FONSECA et al., 2008; COSTA, 2011).

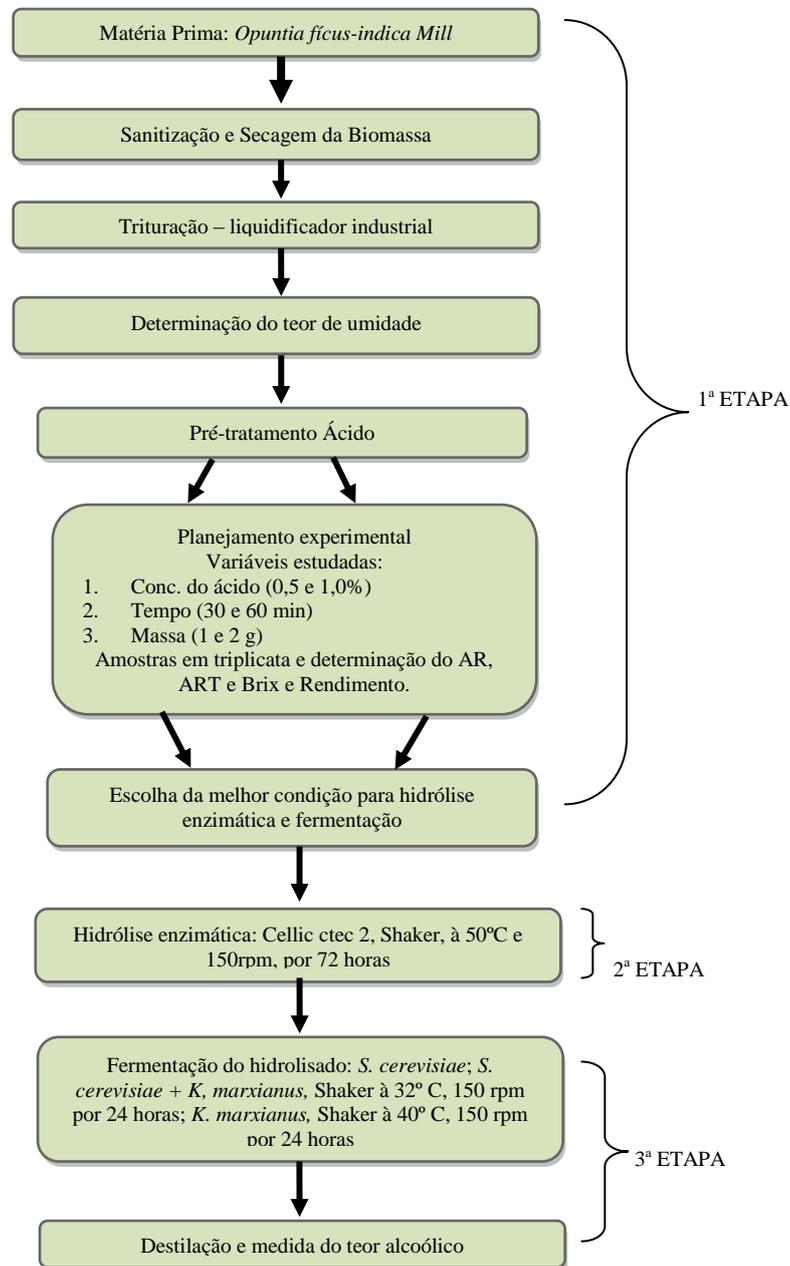
Outro grupo de enzimas produzidas são pectinases. As pectinases degradam substâncias pécnicas, polissacaridasas encontrados nas plantas superiores, atuando no amadurecimento natural de algumas frutas. Três grupos de pectinases são propostos (JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005). As enzimas são classificadas como *protopectinases* - agem degradando a protopectina convertendo-a em polímeros solúveis de pectina; *pectinametilesterase* - desesterificante ou desmetoxilante, responsiva pela catalise da desesterificação da pectina pela remoção dos grupos metoxila, que, por conseguinte produzem ácido pécnico e metanol; e *despolimerizantes* – responsivas pela clivagem das ligações glicosídicas α -1,4 que unem os ácidos galacturônicos nas substâncias pécnicas (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

A espécie *K. marxianus* é utilizada na produção de etanol a partir de soro de leite por , produzir enzimas capazes de assimilar lactose e converter em etanol. A versatilidade metabólica permite emprega-las na produção etanol 2G a partir da biomassa lignocelulósica. Uma das justificativas para produção de etanol seria sua capacidade de se manter viável diante de altas temperaturas, conferindo a esta estirpe termotolerância (CARMO, 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, foi investigada a produção de E2G utilizando a palma forrageira *Opuntia fícus-indica Mill* após pré-tratamento físico, químico, hidrólise enzimática e fermentação (Figura - 9). Todas as etapas experimentais foram desenvolvidas no Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas e contou com a colaboração da infraestrutura do Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos.

Figura 9 – Fluxograma das etapas experimentais envolvidas no processamento, análise e fermentação da *Opuntia ficus-indica* Mill.



Fonte: Acervo do Autor, 2015.

3.1 Matéria prima

A espécie de palma *Opuntia ficus-indica* Mill utilizada neste estudo foi cedida pelo Prof. Dr. José Teodorico e pertence à coleção de genótipos de palma forrageira situado no Centro de Ciências Agrárias – CECA – UFAL. O centro localiza-se nas coordenadas geográficas de latitude de 9°27'S, longitude de 35°27'W e uma altitude média de 127 m acima do nível do mar, com temperaturas médias: máximas de 29°C e mínima de 21°C, e pluviosidade média anual de 1.267,7 mm.

3.2 Extrato enzimático

O complexo enzimático utilizado na hidrólise foi o CELLIC[®] Ctec2 (Novozymes Latin America Ltda), cedido pelo departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

3.3 Microrganismos utilizados

Os experimentos de fermentação foram realizados utilizando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (JAY – 270) e *Kluyveromyces marxianus* (MM III – 41), pertencentes à coleção de Cultura da Universidade de São Paulo – USP. As leveduras foram conservadas em glicerol a 15% a -80 °C. A reativação das leveduras *S. cerevisiae* e *K. marxianus* foi realizada suspendendo as células a cerca de 0,1 mL a 100 mL do meio de cultura líquido YEPD (extrato de levedura a 1%; peptona de carne a 1% e Dextrose a 2%) e incubados a 28° C por 48 horas e sob agitação de 100 rotações por minuto. Posteriormente, o microrganismo foi repicado para tubos de ensaio invertido e placas de Petri, ambos contendo meio de cultura YEPD sólido e armazenadas sob refrigeração a 4° C até o momento do uso.

3.4 Higienização, secagem e trituração para obtenção da farinha de *Opuntia*:

Os cladódios frescos de *Opuntia ficus-indica* foram colhidos na coleção de genótipos do Centro de Ciências Agrárias – CECA-UFAL. Após a coleta, o cladódio foi sanitizado com 100 ppm de hipoclorito durante 15 minutos. Posteriormente, a palma foi lavada em água corrente e cortados em tiras. Após essa etapa, o material foi desidratado em estufa a 45°C. Após a desidratação, o material foi triturado em liquidificador industrial para obtenção de

uma a farinha. A farinha foi utilizada para realizar as análises e base para conversão em etanol.

3.5 Extrativos

A determinação do conteúdo de extrativos da palma iniciou-se com 4,0g da farinha da *Opuntia* (massa seca) depositado em um cartucho e acoplado a um sistema de extração (Soxhlet – Diogolab) e a um balão de fundo redondo contendo 190 mL de etanol 95% sob uma manta de aquecimento. A manta foi ajustada para fornecer um ciclo mínimo de 6 sifões por hora durante 12 horas. Transcorridas às 12 horas, obteve-se um líquido contendo os extrativos, que em seguida foi colocado em rotaevaporizador até se apresentar viscoso. O líquido viscoso foi removido utilizando um pouco de etanol 95%. Colocou-se em uma placa de Petri, previamente tarada e deixou-se em capela ligada até se obter massa constante para determinar a massa de extrativos. As amostras da farinha de *Opuntia* foram caracterizadas *in natura* adaptando-se a metodologia para caracterização química descrita por Gouveia et al. (2007). A determinação de proteína foi realizada segundo o método de Kjeldahl (COTTA et al., 2007). A fração líquida desta etapa de caracterização foi submetida à análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE).

3.5.1 Hidrólise com Ácido Sulfúrico 72%

Amostras de 1g da farinha da *Opuntia* foram pesadas e transferidas para béqueres de 100 mL e tratados com 10 mL de H₂SO₄ 72% v/v, sob agitação a 45°C por 8 min. Em seguida, as amostras foram transferidas para frascos erlenmeyers de 500 mL, adicionando-se 275 mL de água destilada. Os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 min a 120°C. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel de filtro qualitativo. A fração líquida foi transferida para balão volumétrico de 500 mL, o qual teve o seu volume posteriormente completado com água destilada. A solução foi armazenada para quantificação dos ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e lignina solúvel.

3.5.2 Determinação de Lignina Insolúvel na Fração Sólida

A lignina foi determinada a partir do material retido do papel de filtro, o mesmo foi lavado com 1500 mL de água destilada, transferido para pesa-filtros para secagem em estufa a 100 °C até massa constante. A percentagem de lignina insolúvel foi calculada em relação à massa de amostra seca (Equação 3).

$$\%L_{ki} = \frac{M_K - M_C}{M_A} * 100 \quad (3)$$

Onde: L_{ki} = Lignina Klason insolúvel; M_K = massa de lignina insolúvel seca; M_C = massa de cinzas; M_A = massa da amostra seca.

3.5.3 Determinação de Lignina Solúvel na Fração Líquida

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorvância a 280 nm em espectrofotômetro (Equação 4).

$$C_{lig} = 4,187 * 10^{-2} (A_T - A_{PD}) - 3,279 * 10^{-4} \quad (4)$$

Onde: C_{lig} = concentração de lignina solúvel, em g.L^{-1} ; A_T = absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm; $A_{pd} = (c_1 \epsilon_1 + c_2 \epsilon_2)$ – absorvância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações c_1 e c_2 foram determinadas previamente por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) ϵ_1 e ϵ_2 são as absorvâncias e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 $\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

3.5.4 Determinação de Carboidratos, Ácidos orgânicos, Furfural e Hidroximetilfurfural

A determinação de carboidratos e de ácidos orgânicos foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência, o hidrolisado foi aplicado em cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak C18 (Phenomenex). A construção das curvas de calibração dos carboidratos foi

realizada a partir de soluções padrões contendo celobiose, glicose, xilose e arabinose. A construção das curvas de calibração dos ácidos orgânicos foi realizada através da injeção de soluções contendo ácido acético e ácido fórmico. As condições das análises foram: coluna Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad); fase móvel: H_2SO_4 0,005 mol.L⁻¹; vazão de 0,6 mL.min⁻¹; temperatura do forno: 45 °C; em cromatógrafo Shimadzu modelo LC-10AD, empregando um detector de índice de refração Shimadzu modelo RID-6A. A determinação das concentrações de hidroximetilfurfural (HMF) e furfural no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) foi realizado baseado em curvas de calibração de furfural e hidroximetilfurfural determinadas por injeções de soluções padrões destes dois compostos. As amostras dos hidrolisados foram filtradas em membrana de 0,45 µm e analisadas. Condições experimentais: coluna C-18 (Waters, 3,9 x 300 mm), fase móvel solução de acetonitrila e água (1:8) com 1% de solução de ácido acético, vazão de 0,8 mL por min, temperatura do forno 25°C e detector UV/VIS (SPD-10A) a 274 nm, em cromatógrafo Shimadzu.

3.5.5 Determinação de Proteínas

A determinação de proteína na farinha da *Opuntia* foi avaliada aplicando-se a digestão da matéria orgânica que consistiu em pesar 0,5 g de amostra e transferir para um tubo de Kjeldahl adicionando-se 2 g de mistura catalítica (sulfato de sódio, sulfato de cobre e dióxido de selênio na proporção 100:1:0,8 misturados e triturados em almofariz e pistilo). Na capela adicionou-se ao tubo cerca de 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Em seguida, o tubo foi acoplado ao digestor de Kjeldahl, ajustando o aquecedor inicialmente numa posição de aquecimento baixo para evitar a digestão violenta e consequente perda do material. A cada 15 min a temperatura foi elevada lentamente (mais 50°C) até que a mesma chegasse a 350°C. A amostra foi considerada digerida quando apresentou coloração incolor ou levemente esverdeada. Desligou-se o aquecedor e deixou-se por 15 a 30 min para esfriar, colocando na boca do tubo um tampão de algodão.

Na etapa de destilação do nitrogênio foram transferidos 25 mL de ácido bórico a 4% para um Erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se 2 gotas de indicador vermelho de metila (0,25%) e 2 gotas de indicador verde de bromocresol (0,2%). O destilador de Kjeldahl foi preparado, mergulhando a saída do condensador no Erlenmeyer, observando se a extremidade final do Erlenmeyer estava completamente mergulhada a solução de ácido bórico. Em seguida, adicionou-se ao tubo de Kjeldahl contendo a amostra digerida água destilada até um

pouco menos da metade do tubo e 3 gotas de fenolftaleína 1%. O tubo foi acoplado ao destilador de Buchi. Após o aquecer a solução, desligou-se o aquecimento e adicionou-se, lentamente, NaOH 40% até conseguir pH alcalino (mudança para coloração rosa). A destilação foi feita até recolher um volume de destilado de aproximadamente 100 mL.

Na terceira e última etapa do procedimento para determinação de proteína foi realizado a titulação do nitrogênio que consistiu em titular a solução do Erlenmeyer utilizando o ácido clorídrico 0,1 N padronizado, até que surgisse o aparecimento da coloração avermelhada. O teor de proteína foi determinado pela equação 5:

$$\text{Proteína total (g/100g)} = \frac{V_{\text{HCl}} \cdot f_{\text{HCl}} \cdot N_{\text{HCl}} \cdot F \cdot 1,4}{P} \quad (5)$$

Onde: V = volume gasto na titulação com ácido clorídrico 0,1 N; f = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 N; F = fator de correspondência nitrogênio – proteína. O valor de F para alimentos em geral é 6,25; P = massa tomada de amostra.

3.5.6 Determinação de resíduo mineral fixo (cinzas)

Na determinação de cinzas, inicialmente colocou-se o cadinho de porcelana em mufla a 550°C durante 1 hora. Em seguida, o cadinho foi transferido para o dessecador durante 30 min (ou até temperatura ambiente) e pesado em balança analítica. Pesou-se 2 g da amostra neste recipiente previamente tarado. Por conseguinte, a amostra foi incinerada em mufla a 550°C durante 4 horas até a farinha da palma se apresentar branca ou ligeiramente acinzentadas. Em seguida, a amostra foi retirada da mufla, transferida para o dessecador onde esperou-se esfriar durante 30 min. Pesou-se a amostra e calculou de acordo com a equação 6.

$$\text{cinzas (\%)} = \frac{100 \cdot N}{P} \quad (6)$$

N = massa de cinzas (massa final da amostra menos a tara do cadinho)

P = massa tomada da amostra

3.5.7 Determinação de Fibra

Na determinação de fibra, foi inicialmente pesado em um becker de 200 mL 1 g da farinha de *Opuntia* e em seguida adicionou-se 50 mL de H₂SO₄ 1,25%. Deixou-se em ebulição por 30 min, completando com água destilada o volume do becker perdido por evaporação. Posteriormente, foi filtrado em papel de filtro, lavando o material com 25 mL de água destilada quente. Transferiu-se o material retido no papel de filtro para um becker de 200 mL com a ajuda de 50 mL de NaOH 1,25%. Deixou-se em ebulição por 30 min, completando com água destilada o volume do becker perdido por evaporação. O líquido foi filtrado em papel de filtro quantitativo previamente tarado, lavou-se com 100 mL de água quente e transferiu-se para estufa a 100° C onde se esperou secar por aproximadamente 2 horas. O papel filtro contendo o resíduo foi pesado e anotou-se o peso. As amostras foram levadas para mufla a 550° em cadinho previamente tarado. A fibra bruta foi determinada utilizando a equação 7.

$$\begin{aligned} \text{Cálculo: } \% \text{ Fibra bruta} &= \left(\frac{\text{papel com resíduo seco} - \text{papel}}{\text{massa da amostra}} \right) \cdot 100 & (7) \\ \% \text{ Fibra real} &= \% \text{ Fibra bruta} - \% \text{ Cinzas} \end{aligned}$$

3.6 PRÉ-TRATAMENTO

3.6.1 Pré-Tratamento com Ácido sulfúrico diluído

Amostras contendo 1 e 2g (farinha) de *Opuntia ficus-indica* Mill, em triplicata, pesadas com precisão de 0,1 mg, foram transferidas para erlenmeyers de 100mL, adicionando-se 20mL de H₂SO₄ diluído (0,5% e 1,0%). Os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e autoclavados nos intervalos de tempo 30 min 60 min a 120°C. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel filtro. A fração líquida foi armazenada para análises posteriores de AR, ART e Brix.

3.6.1.1 Planejamento para o pré-tratamento

O pré-tratamento com ácido sulfúrico foi realizado através de um planejamento experimental com três fatores: concentração de ácido, tempo de pré-tratamento e quantidade de massa, com o objetivo de verificar, entre os fatores estudados a melhor condição para otimizar a etapa de pré-tratamento e foram realizados em triplicata. O ácido sulfúrico foi escolhido pelo baixo custo, com alta taxa de reações em baixas concentrações, principalmente em concentrações inferiores a 4% (GALBE; ZACCHI, 2007). A resposta avaliada nesse planejamento foi determinada pelos níveis de açúcares redutores totais (ART) na solução. A melhor condição de pré-tratamento da biomassa, em termos de ART obtido, foi escolhida para seguir às etapas posteriores de hidrólise e fermentação. A visualização dos fatores que influenciaram nos valores de açúcares fermentáveis, relatando quem mais significou foi determinado pela construção do gráfico de Pareto utilizando o programa STATISTICA®.

Tabela 5 – Variáveis do planejamento utilizadas na etapa de pré-tratamento:

	Nível inferior (-)	Nível superior (+)
Conc. de Ácido sulfúrico (%)	0,5	1
Tempo (min)	30	60
Massa (g)	1	2

A realização dos experimentos de pré-tratamento ácido ocorreram em várias etapas, sendo que os ensaios com as mesmas condições de tempo de aquecimento e temperatura foram realizados juntos na autoclave. O ensaio com ácido procedeu com a massa seca da farinha da *Opuntia* e adicionada em Erlenmeyer com proporções de 1:20 e 2:20 (massa de material seco/volume de solução ácida), modificado de SILVA et al., 2010. As soluções de ácido sulfúrico foram de 0,5% e 1,0%. Uma vez que os Erlenmeyers receberam a biomassa e o ácido, foram levados para a autoclave a 120° C nos tempos descritos (tabela 5). A pós o tempo de experimento, as amostras foram retiradas da autoclave e filtradas em papel filtro. O licor obtido desse pré-tratamento foi utilizado para determinar os valores de açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART) e sólidos solúveis (Brix).

3.6.1.2 Determinação dos sólidos totais (Brix)

A determinação dos sólidos totais foi feita utilizando o refratômetro modelo *HI 96801*, com uma gota do líquido com as amostras em temperatura ambiente.

3.6.1.3 Determinação dos Açúcares Redutores Totais (ART).

A determinação dos açúcares redutores totais (ART) foi realizada pelo método espectrofotométrico, proposto por Miller (1959), que utiliza a solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e leitura a 540 nm. Para isto, foi necessário o preparo de uma curva padrão de glicose. Na análise de açúcares redutores totais é necessário realizar uma hidrólise ácida prévia.

3.6.1.4 Preparo da Solução de Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

No preparo da solução de DNS utilizou-se 1g de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) dissolvido à temperatura ambiente em 20mL de NaOH 2N e 50 mL de água destilada. Em seguida, pesou-se 30g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio – $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) e adicionou-se ao DNS quando estava totalmente dissolvido. Para facilitar a dissolução, a solução foi aquecida até no máximo 40°C. Após a adição do sal Rochelle, completou-se o volume para 100 mL com água destilada. A solução foi armazenada em frasco escuro e na geladeira.

3.6.1.5 Hidrólise dos Açúcares redutores totais

A hidrólise dos açúcares redutores totais foi realizado com amostras obtidas após o pré-tratamento ácido. Foram coletadas 1,0 mL da solução e transferidas para tubos de ensaio e em seguida foi adicionado 5 mL de H_2SO_4 1,5M, levando a banho fervente por 20 min e agitando ocasionalmente para hidrolisar os polissacarídeos e outros açúcares não-redutores (ao menos a cada 5 min). Após esse tempo, a amostra foi resfriada e transferida para béquer. Adicionou-se 3 gotas de fenolftaleína 1% e, cuidadosamente, com o auxílio de pipeta Pasteur, NaOH 26% até a coloração rósea. Em seguida adicionaram-se gotas de H_2SO_4 1,5 M até voltar à

coloração original. A amostra foi homogeneizada e transferida para proveta, completando o volume com água destilada até 20 mL.

3.6.1.6 Reação para Determinação dos Açúcares redutores pelo Método do DNS

A reação foi conduzida com 0,25 mL das amostras do pré-tratamento ácido mantidos em tubo de ensaio de 20 mL com tampa e adicionou-se 0,5 mL de água destilada. Quando o banho de água estava fervendo, adicionou-se 0,25 mL do reagente de DNS e então a amostra foi levada para o banho fervente por 5min, permitindo que a reação entre a amostra e o DNS acontecesse. Após o tempo de reação, a amostra foi retirada da água fervente e colocada em banho de gelo. Ao atingir a temperatura ambiente, ajustou-se o volume com água destilada para 5mL ou seja, adicionou-se 4 mL de água destilada e realizou-se a leitura da amostra em espectrofotômetro, a 540 nm, por absorbância. A partir da curva padrão de concentrações conhecidas de glicose obteve-se a equação da reta, que permitiu a realização do cálculo da concentração de ART em cada amostra.

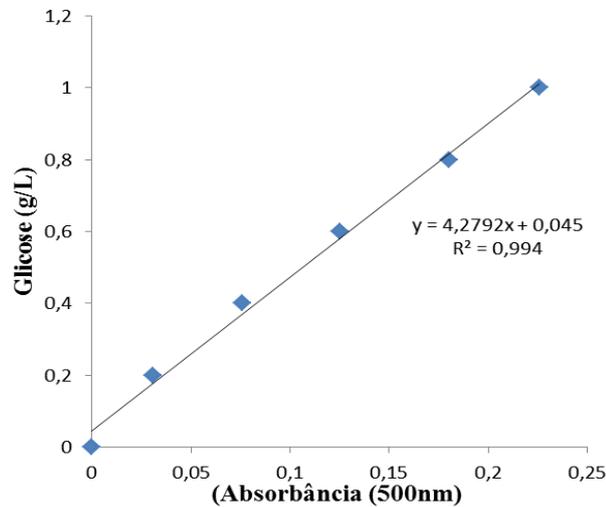
3.6.1.7 Preparo da Curva Padrão de Glicose

Uma solução de glicose 1 g L^{-1} foi preparada a partir de 0,05 g de glicose diluída em 30 mL de água destilada. Em seguida, transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 50 mL, e o volume foi completado com água destilada. Posteriormente, esta solução padrão foi diluída em série para obter as diferentes concentrações da curva (Tabela 6).

Tabela 6 – Diluições para o preparo da curva padrão de glicose

Volume da solução de glicose 1 g. L^{-1} (mL)	Volume H_2O (mL)	Volume total (mL)	Concentração de glicose (g.L^{-1})
0,05	0,20	0,25	0,2
0,10	0,15	0,25	0,4
0,15	0,10	0,25	0,6
0,20	0,05	0,25	0,8
0,25	0,00	0,25	1,0

Gráfico 1 – Curva padrão de glicose plotando absorvância x concentração. Através da regressão linear, é determinada a equação da curva e o coeficiente de correlação, onde y= é o valor da absorvância obtida.



Fonte: Acervo do Autor, 2015.

Obs: A curva é obtida em espectrofotômetro. A cada troca de reagente uma nova curva deve ser realizada.

Na reação de DNS para uma melhor precisão dos resultados, o coeficiente de correlação (R^2) deve ser maior que 0,97 (Gráfico - 1). A concentração de ART é dada pela equação 8:

$$\text{ART (g.L}^{-1}\text{)} = \text{diluição de hidrólise} \times \text{absorbância} \times \text{fator da curva padrão} \quad (8)$$

3.7 Hidrólise enzimática

A atividade da enzima CELLIC Ctec 2 foi determinada de acordo com Silva (2012). Os experimentos submetidos à hidrólise enzimática foram realizados utilizando apenas com a melhor condição de ambos os pré-tratamentos testados. Sabendo-se da atividade enzimática (285 FPU), foi utilizado 135 μL da enzima para 1 g de carga de sólidos (1 g da farinha da *Opuntia* pré-tratada: 40 mL de solução). A solução para hidrólise continha 40 mL de tampão

citrato, pH 4,8 (50 mM), e 135 μ L da enzima. A hidrólise enzimática ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 mL sob agitação à 50°C e 150 rpm, por 72 horas. Após a hidrólise enzimática, o ART e AR foram determinados conforme já descrito nos itens 3.6.1.5 e 3.6.1.6.

3.8 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO

3.8.1 Preparo do inóculo e fermentação

Os microrganismos armazenados foram transferidos para 3 Erlenmeyers de 250 mL contendo o meio de cultura YEPD (extrato de levedura 1%, peptona de carne 1% e dextrose 2%). Após a transferência das leveduras para o meio de cultura, os erlenmeyers foram incubados à 28° C, por 48 horas. Após o período de incubação, o inóculo foi utilizado no processo de fermentação (Carmo, 2013). Os ensaios ocorreram de acordo com Wolf, 2011, onde o líquido contendo glicose resultante da hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos foi utilizado na etapa de fermentação.

O estudo da produção de etanol foi realizado com três tipos de fermentação. O primeiro: meio de fermentação foi preparado com o hidrolisado contendo *Saccharomyces cerevisiae*, com volume final de 38 mL de meio (F - Sc). O segundo meio de fermentação 2 foi preparado com o hidrolisado contendo *Kluyveromyces marxianus*, com volume final de 38 mL de meio (F-Km). O terceiro meio de fermentação 3 foi preparado com hidrolisado contendo *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*, com volume final de 38 mL de meio (F-SK). As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 100 mL, contendo 38 mL do meio de cultura descrito no item 3.8, com três repetições para cada fermentação, em incubadora regulada à temperatura de 30° C e 35° C, com agitação. Na etapa de fermentação foram adicionados em erlenmeyers 30 mL da fração líquida do hidrolisado, 0,6 g de peptona bacteriológica e 0,3 g de extrato de levedura. O meio foi esterilizado à 121°C por 15 min. Após isso, foi adicionada 6,7 mL da solução de sulfato de magnésio e fosfato de amônio e por último, 1 mL de massa das leveduras.

O estudo cinético do processo fermentativo com base no consumo de açúcares redutores totais das fermentações (F – Sc, F-Km e F-SK) foi realizado durante 24 horas, com amostragens nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas. As fermentações F - Sc e F-SK ocorreram em a 30°C, 200 rpm por 24 horas, e a F-Km em 35° C, 150 rpm por 24 horas. Após

essa etapa, o AR, teor alcoólico, conversão enzimática, rendimento da fermentação, eficiência fermentativa e viabilidade celular foram determinados. A viabilidade das leveduras do processo de fermentação foi determinada através de técnicas de contagem em câmara de Neubauer onde foram contados quatro retículos centrais de cada um dos 25 campos, nos 2 quadrados maiores da lâmina, isto para cada amostra de F – Sc, F-Km e F-SK. Após a etapa de fermentação, a viabilidade celular foi determinada a partir de uma suspensão do cultivo em 1mL de solução de azul de metileno e transferido para a câmara de Neubauer, onde as células mortas são coradas de azul e as células vivas (equação 9).

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = (\text{N}^\circ \text{ de células vivas} / \text{N}^\circ \text{ total de células}) \times 100 \quad (9)$$

A conversão enzimática foi obtida pela relação entre o ART após hidrólise enzimática e ART do pré-tratamento x 100 (equação 10). O rendimento da fermentação (Rf) foi calculado pela relação entre a quantidade de etanol produzido (gL^{-1}) e a quantidade de ART (gL^{-1}) presente inicialmente (Equação 11). A eficiência da fermentação (Ef) foi determinada pela relação entre o rendimento real da fermentação (Rf) e o rendimento teórico (Equação 12) de 0,51 (NOGUEIRA; VENTURINI-FILHO, 2005).

$$\text{Conversão enzimática} = \frac{\text{ART PH} * 100}{\text{ART PTA}} \quad (10)$$

Onde ART PH = ART obtido após hidrólise; ART PTA = ART obtido no pré-tratamento ácido.

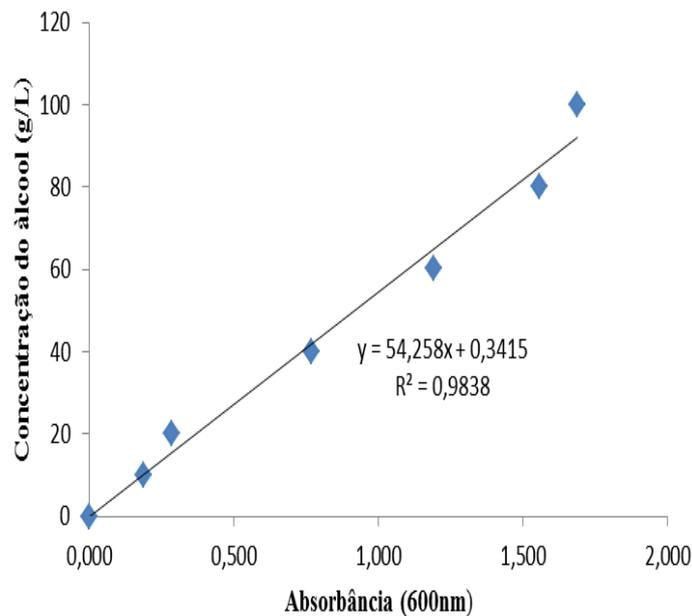
$$R_f = \frac{\text{Etanol produzido } (\frac{\text{g}}{\text{L}})}{\text{ART inicial } (\frac{\text{g}}{\text{L}})} \quad (11)$$

$$E_f = \frac{\text{Rendimento real}}{\text{Rendimento teórico (0,51)}} \quad (12)$$

3.9 DESTILAÇÃO

O teor alcóolico foi determinado a partir do destilado das fermentações utilizando o método espectrofotométrico pela técnica do dicromato de potássio (ABUD, 1997). Cada amostra foi destilada por 3 minutos, contados a partir do início de fervura que deu origem ao escoamento do destilado. Após 3 minutos, o líquido coletado no Erlenmeyer foi transferido para um balão e completando o volume para 50 mL com água destilada. Uma alíquota de 2 mL do destilado foi submetido a uma reação a 60° C por 30 minutos com 2 mL de solução de dicromato de potássio e leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro a 600nm. A concentração de etanol foi determinada a partir de uma curva de calibração do dicromato de potássio, com amostras de etanol conhecidas, submetidas à mesma reação (Gráfico-2).

Gráfico 2 – Curva de Calibração do dicromato de potássio obtida em espectrofotômetro demonstrando a linearidade pela influência das concentrações de álcool.



Obs: A curva é obtida em espectrofotômetro. A cada troca de reagente, nova curva deverá ser inserida.

Fonte: Acervo do autor, 2015.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização da *Opuntia ficus-indica* In Natura

O genótipo *Opuntia ficus-indica* avaliado apresenta 22.90% de carboidratos correspondendo à glicose, xilose e arabinose (Tabela - 7). A glicose foi o carboidrato de maior teor com 12.57% quando comparados à xilose (7.79%) e arabinose (2.54%). Os resultados reportados para glicose, xilose e arabinose foram menores quando comparados com os valores descritos por Kuloyo (2012), cujas frações foram correspondentes a 23,1%, 3.9% e 3.8% respectivamente. Entretanto, o teor total de açúcares determinado é maior que os descritos por Ginestra et al., (2009) que obtiveram 21,2% de carboidratos totais.

Tabela 7 – Quantificação dos monômeros de pentose, hexose e outros compostos estruturais presentes na palma forrageira *Opuntia ficus-indica* in natura investigados neste estudo e comparados com outros trabalhos.

Composição da <i>Opuntia</i> (%)	Caracterização da <i>Opuntia</i> deste estudo	Caracterização da <i>Opuntia</i> por (KULOYO, 2012)	Caracterização da <i>Opuntia</i> por (GINESTRA et al., 2009)
Glicose	12,57±0,07	23.1	15.3
Xilose	7,79±0,04	3.9	1.9
Arabinose	2,54±0,02	3.8	4.0
Açúcares totais determinados	22,9	30.8	21.2
Lignina Total	10,69±0,37	7.9	16
Proteínas	6,8±0,06	7.5	6.42
Fibras	17,0±0,02	-	-
Extrativos	13,37±0,04	24.3	17.7
Cinzas	12,58±0,02	16.8	-
Total	83,34	87,30	61,32

O teor de lignina determinada neste estudo foi maior do que a lignina determinada por Kuloyo (2012) e menor para determinação de Ginestra et al (2009) (Tabela - 7). Os valores de proteínas foram semelhantes nos três estudos. A fração de fibras encontrada na palma *in natura* de 17% é similar ao valor de 18% determinado por Stintzing e Carle (2005).

Os valores determinados por Kuloyo (2012) para extrativos foram de 24,3% para a palma *Opuntia ficus-indica*. Outros estudos, como os mencionados por Ginestra et al., (2009) descreveram 17,7% para a mesma biomassa e o deste estudo foi 13,37%, sendo o menor valor entre as comparações. O menor teor de cinzas encontrado para a *Opuntia* foi determinado neste estudo com 12,58% quando comparado com o valor descrito por Kuloyo (2012) que encontrou 16,8% de cinzas.

As cinzas é um elemento constituído por sulfatos, oxalatos, carbonatos, silicato de cálcio, potássio e magnésio, e outros sais em menores quantidades (BIANCHI, 1995). Os valores podem variar entre 1 a 10%. O percentual de 12,58% de cinzas encontradas neste estudo esteve mais próximo da caracterização realizada por Neto (2010) que apresentou percentual de 9,16% em um estudo realizado com a pré-hidrólise ácida da palma forrageira. Esta diferença pode estar relacionada com a constituição de cada variedade da *Opuntia*, tratos culturais e diferenças relacionadas à idade e partes de planta (MACEDO; ROUSSET; VALE, 2014).

Os constituintes da biomassa podem variar e se apresentar em quantidades diferentes mesmo se tratando da mesma espécie vegetal. Alguns fatores que implicam nesse mecanismo são a disponibilidade de luz, água, nutrição, temperatura, localização geográfica, condição de colheita e estocagem como relatam Gobbo-Neto e Lopes (2007).

Tabela 8 - Porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina da *Opuntia ficus-indica in natura* e seus monômeros de pentose, hexose e ácidos orgânicos obtidos em cromatografia líquida de alta eficiência. (CLAE).

Palma <i>in natura</i> (%)	
Celulose	12,87±0,07
Glicose	12,57±0,07
HMF	0,30±0
Hemicelulose	15,09±0,06
Arabinose	2,54±0,02
Xilose	7,70±0,04
Ácido Acético	1,23±0,02
Ácido Glucurônico	2,52±0
Furfural	1,10±0
Lignina Total	10,69±0,37
Klason	6,28±0,29
Solúveis	4,41±0,10
Total	38,65

Os valores de celulose, hemicelulose e lignina foram 12,87%, 15,09% e 10,69% respectivamente. A fração de celulose foi desmembrada em glicose 12,57% e Hidroximetilfurfural (HMF) 0,30% (Tabela-8). O HMF é um composto inibidor de fermentação formado na etapa de pré-tratado ácido. Neste estudo foi determinado dois carboidratos para a hemicelulose, arabinose e xilose com percentuais de 2,54% e 7,70% respectivamente. Outros compostos inibidores presentes na hemicelulose foram detectados como ácido acético (1,23%) ácido glucurônico (2,52%) e furfural (1,10%). A lignina total foi determinada pelas frações de lignina insolúvel (Klason) e lignina solúvel com representatividade de 6,28% e 4,41%, respectivamente.

A determinação de compostos inibidores revela que o pré-tratamento foi severo, uma vez que essas substâncias agem no metabolismo das leveduras prejudicando o desempenho da fermentação (KUHAD et al, 2010). Levando em consideração o efeito desses inibidores sobre a fermentação, podemos sugerir que o teor alcóolico obtido nas três fermentações poderia ter alcançado maiores valores se tratados pelo método de destoxicação. Os valores de 0,30% de HMF e 1,10% de furfural presentes neste estudo foram similares aos encontrados por Nascimento (2011) que obteve 0,3% de HMF e 1,40% de furfural em um inquérito utilizando bagaço da cana-de-açúcar *in natura*.

4.2 Matriz de planejamento do Pré-Tratamento Ácido.

O planejamento experimental com todas as condições do pré-tratamento, e os resultados obtidos em triplicata (Tabela 10 e 11). Os resultados descritos foram determinados a partir de amostras que apresentaram os melhores teores de açúcares nas etapas de pré-tratamento. Dessa maneira, esse critério foi considerado para seguir com as etapas de hidrólise enzimática e fermentação.

Tabela 9 – Matriz de planejamento fatorial com todas as condições estudadas.

Ensaio	Conc. de ácido (%)	Tempo (min)	Massa (g)
1	0,5	30	1
2	0,5	30	2
3	0,5	60	1
4	0,5	60	2
5	1,0	30	1
6	1,0	30	2
7	1,0	60	1
8	1,0	60	2

A condição que representou maior teor de açúcares considerando os valores de ART e AR foi a condição do ensaio 6 (Tabela - 10). O ensaio determina o tratamento de 2g da biomassa pré-tratada com 1,0% de ácido sulfúrico por 30 minutos gerando concentrações de ART de 33,84 (g.L⁻¹) e AR de 8,46 (g.L⁻¹) sendo a condição escolhida para seguir às etapas de hidrólise enzimática e fermentação.

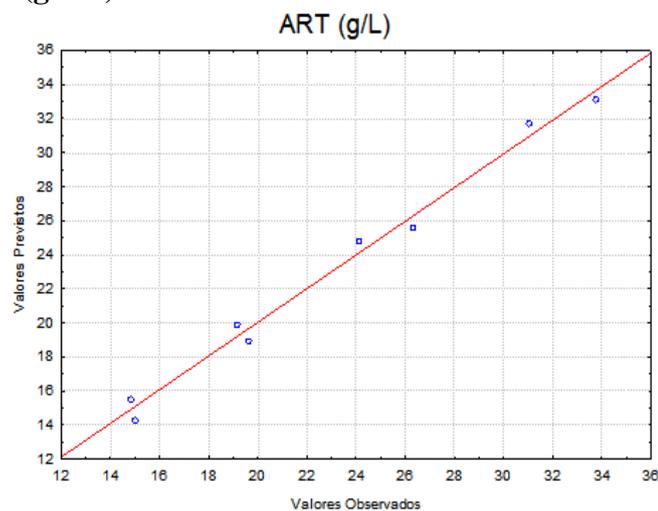
Tabela 10 – Valores de ART, AR, BRIX e Rendimento mássico obtidos em todas as condições do planejamento experimental do pré-tratamento ácido.

Ensaio	ART (g.L ⁻¹)	AR (g.L ⁻¹)	BRIX	RENDIMENTO (%)
1	14,99±0,12	2,76±0,18	4,5±0	47,00±0,03
2	24,11±0,04	4,51±0,71	7,4±0	56,05±0,2
3	14,82±0,04	2,95±0	4,7±0	46,4±0,9
4	26,29±0,24	5,47±0,19	7,3±0,05	52,6±0,1
5	19,18±0,04	4,38±0,32	5,8±0	45,75±2,25
6	33,84±0,16	8,46±0,13	8,6±0	52,4±2,1
7	19,63±0,32	4,25±0,12	5,9±0	45,7±3,1
8	31,01±2,42	7,62±0,03	7,1±0	51,45±0,55

Onde os ensaios corresponderam as variáveis: Concentração de ácido (0,5, 1,0%), tempo (30, 60min), massa (1, 2g).

O tempo do processo de pré-tratamento ácido, resulta em diferença entre os valores de AR, ART e BRIX (Tabela 10 e 11). Independente da concentração de ácido utilizada no planejamento experimental, mesmo que os valores de AR tenham sido pouco maiores para 60 minutos do que em 30 minutos. Menores concentrações de ácido sulfúrico apresentam maior eficiência no pré-tratamento da palha e do sabugo de milho (SANTOS, 2014). O comportamento próximo à linearidade demonstra um ajuste significativo para o planejamento experimental conferindo confiabilidade aos experimentos (Gráfico – 3).

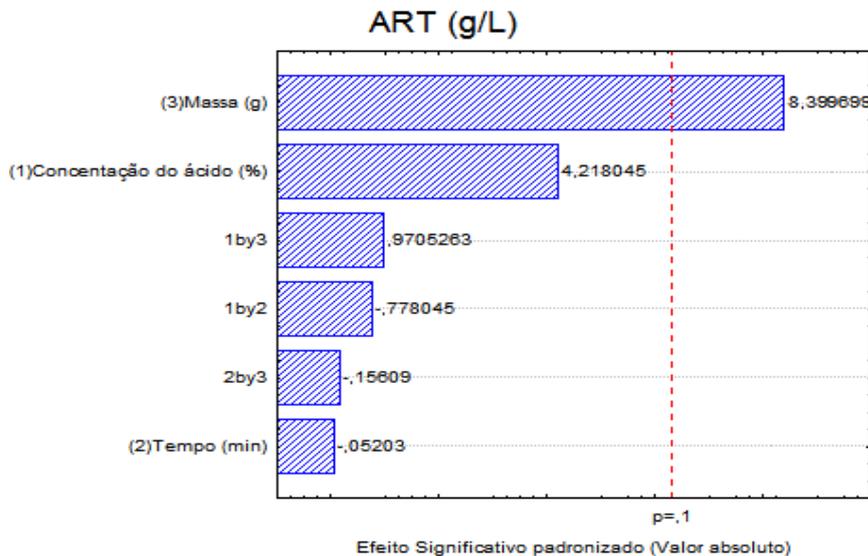
Gráfico 3 - Ajuste ao Modelo Linear demonstrando os valores observados *versus* valores previstos de ART em (g .L⁻¹).



Fonte: Acervo do Autor, 2015.

A linearidade dos dados experimentais entre os valores previstos e valores observados entre as razões estudadas de concentração de ácido, tempo e massa apresenta o limite de confiança de 90% (Gráfico 3). A provável explicação para não ter alcançado a confiança de 95% deve estar relacionada com os baixos intervalos entre as variáveis estudadas.

Gráfico 4 – Influência dos fatores no planejamento experimental 2³ e o efeito significativo do valor absoluto a partir das variáveis: massa, concentração de ácido e tempo.



Fonte: Acervo do Autor, 2015.

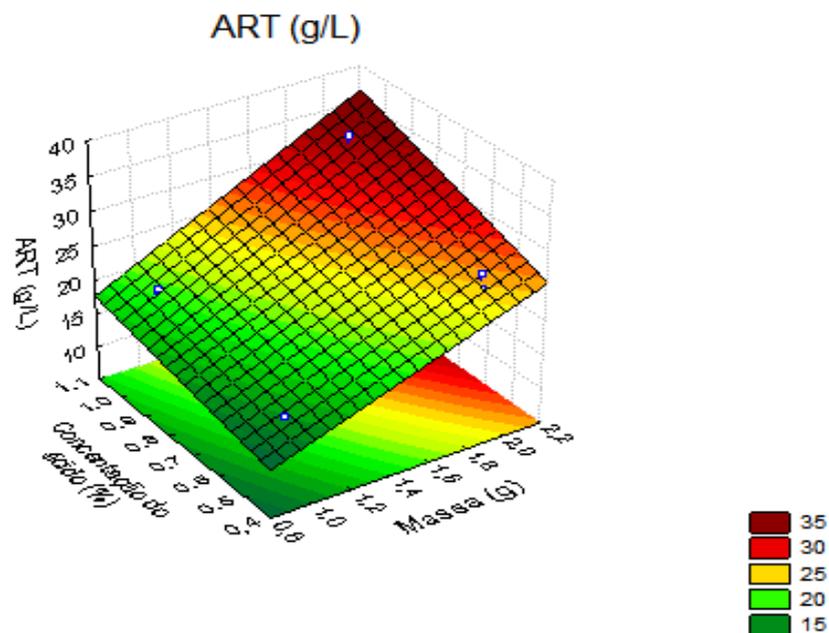
A influência da massa é superior às outras duas variáveis (concentração de ácido e tempo), de modo que acaba por minimizar as influências destas duas variáveis sobre a resposta em estudo (Gráfico 4). Desse modo, surge-se avaliar em estudos futuro à análise dessas variáveis em resposta a qualidade do licor hidrolisado antes da etapa hidrólise enzimática.

A análise estatística mostra que o efeito da massa foi o que se mostrou mais significativo entre os fatores estudados. O fator massa aumenta em média 11,64% do ART quando se passa do nível inferior para o nível superior desse fator, indicando que para trabalhar com maiores valores de ART devem-se utilizar 2 g de biomassa. Já o efeito da concentração de ácido indicou que um aumento médio de 5,84% no teor de ART é obtido quando eleva-se para 1% a concentração de ácido usada no pré-tratamento. O fator tempo foi o que apresentou menor valor do seu efeito no sistema. No entanto, o seu efeito combinado com a concentração de ácido e/ou com a massa indica que se deve trabalhar com menores valores de tempo para se obter maiores percentuais de ART.

O aumento de açúcares redutores totais teve maior liberação nas concentrações de 1,0% (Tabela 11; Gráfico 4) Nas concentrações de 0,5% foi possível verificar uma grande

redução desses açúcares. Observa-se ainda que, o aumento na razão de massa de 1g para 2g acarreta num aumento do somatório das concentrações de ART no pré-tratamento. A análise de superfície de resposta (Gráfico 5) confirma que o aumento da quantidade de massa sob maior concentração de ácido (1,0%) no pré-tratamento determina a resposta para maior quantidade de açúcares fermentescíveis.

Gráfico 5 – Superfície de resposta da influência da massa sobre concentração de ácido em relação ao percentual de ART



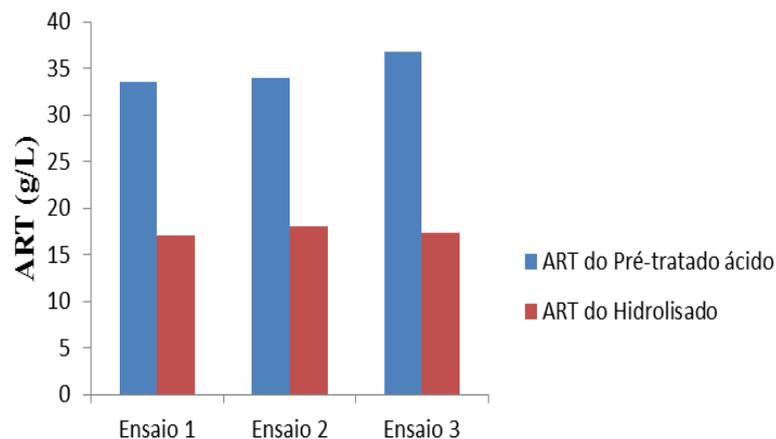
Fonte: Acervo do Autor, 2015.

A análise da superfície demonstrara que a concentração de ácido reduz o teor de ART quando se passa no nível superior (1,0%) para o nível inferior (0,5%) desse fator. Dessa forma, revelou que para se trabalhar com maiores valores de ART neste estudo deve-se utilizar H_2SO_4 nas concentrações de 1,0% combinado com o tempo de 30 minutos (Gráfico 5).

4.3 Hidrólise enzimática

A especificidade da enzima aos constituintes do substrato está diretamente relacionada com a disponibilização de açúcares fermentescíveis. O resultado da atividade enzimática foi de 245 FPU.mL⁻¹ para as celulases totais. Os valores de ART nas amostras pré-tratadas com ácido foram superiores àqueles determinados após hidrólise enzimática (Gráfico 6). Esse efeito pode ser resultado da ação dos compostos inibidores (Tabela 10), uma vez que os mesmos podem ter influenciado para diminuir a eficiência de hidrólise enzimática das celulases.

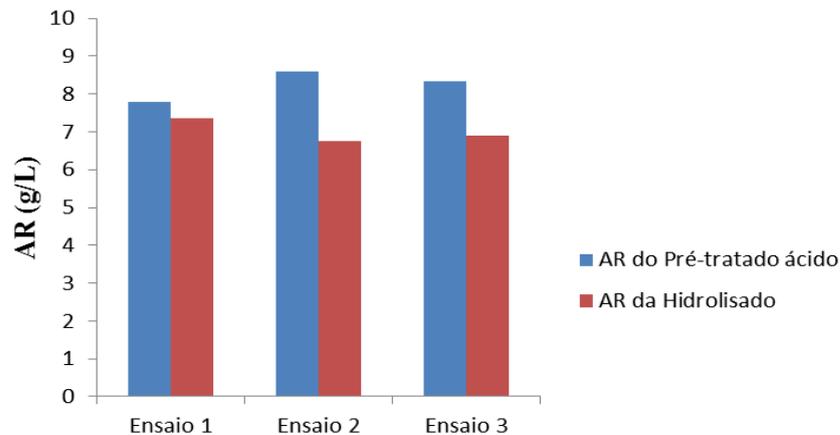
Gráfico 6 – Comparação dos resultados de ART obtidos em triplicata para o pré-tratamento ácido da melhor condição com o ART da hidrólise enzimática.



Fonte: Acervo do Autor, 2015.

Os perfis de concentrações para os valores de AR apresentaram comportamentos similares comparados ao ensaio 1 e valores próximos para os ensaios 2 e 3 (Gráfico 7). O tempo de hidrólise aplicado a biomassa foi aceitável quando consideramos que os valores dos três ensaios não foram estatisticamente diferentes. Neste contexto, vale lembrar que a concentração de 30 FPU.g⁻¹ da enzima realizada na etapa de hidrólise foi adequada (SILVA, 2012).

Gráfico 7 – Comparação dos resultados de AR obtidos em triplicata para o pré-tratamento ácido da melhor condição com o AR da hidrólise enzimática.



Fonte: Acervo do Autor, 2015.

A biomassa *Opuntia ficus-indica* é muito rica em pectina, e uma vez hidrolisada, gera unidades de pectinase conhecidas como ácido galacturônico (Kuloyo, 2012). A inclusão de enzimas pectinase as celulases (coquetel de enzimas) em biomassa rica em pectina é necessária para solubilização da pectina e maior produção de açúcares (GROHMANN et al., 1995). Isso poderia ter melhorado tanto a concentração final de etanol obtido como ter gerado mais valor a biomassa *Opuntia ficus-indica*.

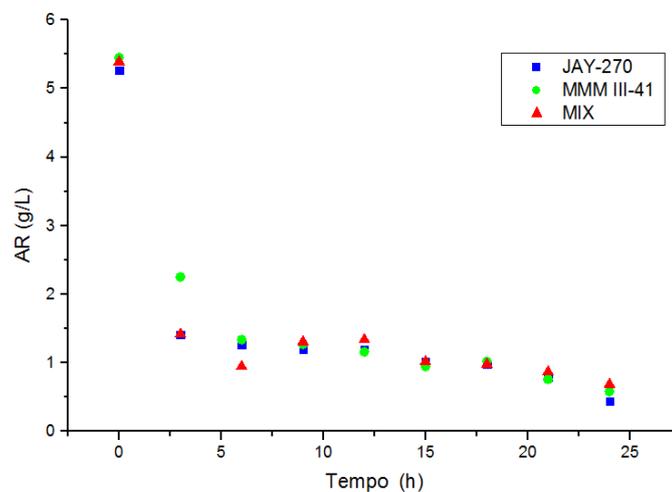
4.4 Fermentação do Hidrolisado

Os fatores avaliados para o acompanhamento da fermentação foram a AR, a viabilidade celular, a conversão enzimática, o teor alcóolico, o rendimento e eficiência de fermentação. Durante as fermentações foi avaliado o consumo de AR nos pontos de 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 horas, das amostras para a construção da cinética do consumo de açúcares redutores (Gráfico - 8).

Na cinética do consumo de açúcares redutores observa-se que durante 24 horas de fermentação o AR foi reduzido indicando consumo de açúcares pelas leveduras, tendo em vista que os valores de AR iniciais decresceram nas 24 horas de fermentação. A produtividade volumétrica de etanol descrita nas fermentações (F-Sc, F-Km e F-SK) justifica o declínio

sinérgico do AR para ambas as leveduras. Uma vez que os resultados alcançados foram próximos. Transcorridas às 6 horas de fermentação, nota-se que não houve diferença na assimilação dos açúcares para as 3 condições de fermentação realizada.

Gráfico 8 – Cinética do consumo de AR determinada a cada 3 horas durante início e final da fermentação (24 horas).



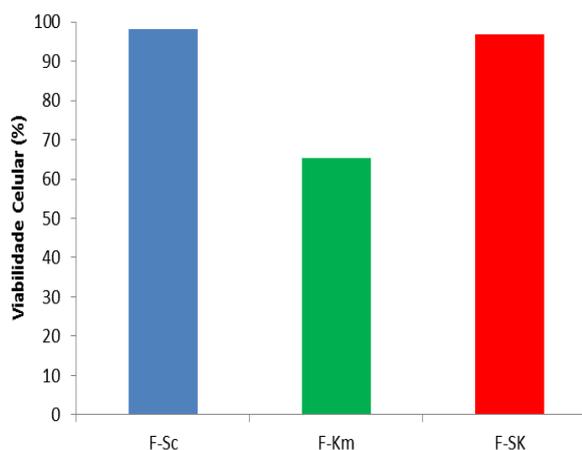
Fonte: Acervo do Autor, 2015.

As leveduras consumiram a exaustão os açúcares no meio de fermentação. Os açúcares residuais (AR) foram de $0,44 \text{ g.L}^{-1}$ para F-Sc, $0,58 \text{ g.L}^{-1}$ para F-Km e $0,69 \text{ g.L}^{-1}$ para F-SK. A avaliação da cinética da fermentação através do AR é importante por valorizar a maioria dos açúcares fermentescíveis, como é o caso dos monômeros de glicose. No pré-tratamento ácido são liberados grandes quantidade de ART através de açúcares maiores que precisam ser quebrados na etapa de hidrólise enzimática em monômeros menores como exemplos as pentoses e hexoses que, por conseguinte, serão assimilados pelos microrganismos fermentativos para produção de etanol. Na etapa de fermentação acompanhando-se a cinética, foi possível notar o consumo de açúcares redutores similares por meio das três condições de fermentação. Assim como se observou também melhor viabilidade celular para a *Saccharomyces cerevisiae* e menor viabilidade celular para a *Kluyveromyces marxianus*.

4.5 Viabilidade Celular

Os valores da viabilidade celular (Gráfico – 9) das leveduras *S. cerevisiae* (fermentações F-Sc e F-SK), *K. marxianus* (fermentações F-Km e F-SK) foram expressos como média ao final da fermentação, após 24 horas.

Gráfico 9 – Viabilidade celular das leveduras *S. cerevisiae* (F-Sc), *K. marxianus* (F-Km) e F-SK (levedura combinadas) obtidas no final da etapa de cada fermentação (24 horas).



Fonte: Acervo do Autor, 2015.

As médias dos resultados de viabilidade celular foram maiores para as amostras F-Sc e F-SK (mistura das leveduras *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*), visto que para F-Sc obteve-se 98,04% e para F-SK foi de 96,94%. Analisando o desempenho de viabilidade da *K. marxianus* (F-Km) verifica-se um baixo percentual de viabilidade celular, pois, reportou-se para esse ensaio a média de 65,29%. Quando comparamos com o desempenho dos demais ensaios (F-Sc e F-SK). A menor viabilidade celular da *K. marxianus* podem está associado a uma maior sensibilidade à presença de inibidores que por sua vez comprometem o metabolismo da levedura, fazendo com que essa levedura perca parte do seu desempenho durante o processo. A hipótese necessita ser testada. No pré-tratamento ácido formam-se compostos tóxicos, denominados inibidores, e essas substância afetam o processo de fermentação alterando a fisiologia das leveduras (TAHERZADEH et al., 2000). Uma vez que ocorra a interferência no metabolismo dos organismos fermentativos, irá ocasionar a redução e eficiência na geração do produto desejado.

Tabela 11 – Resultados obtidos após pré-tratamento ácido, hidrólise enzimática e fermentação.

Ensaio	ART do Pré-tratado ácido (g.L ⁻¹)	ART da hidrólise (g.L ⁻¹)	Conversão enzimática (%)	Etanol produzido (g.L ⁻¹)	Rendimento da fermentação (%)	Eficiência da fermentação (%)
F-Sc	33,60±0,24	18,1±0,21	53,86	5,85±0,05	32,32	63,37
F-Km	33,93±0,37	18,87±0,3	55,61	5,15±0,37	27,29	53,50
F-SK	36,80±0,61	17,50±0,13	47,55	5,74±0,05	32,8	64,31

Onde: F-Sc: JAY-270 – Fermentação com *Saccharomyces*; F-Km: MM III 41 - Fermentação com *Kluyveromyces*; F-SK: Fermentação com *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*.

Os resultados exibidos para o etanol produzido foram muito próximos entre as fermentações F-Sc, F-Km e F-SK. No entanto, de acordo com esses resultados a F-Km foi a que apresentou menor produtividade volumétrica de etanol que foi 5,15 g.L⁻¹. O que justifica dessa forma, seu baixo rendimento de fermentação 27,29% quando comparado com os valores das F-Sc (32,32%) e F-SK (32,8%). Apesar de a *Kluyveromyces* apresentar produtividade volumétrica menor do que a *Saccharomyces*, esses achados estão de acordo com a literatura, ao mostrarem que *Kluyveromyces* pode alcançar a produção de etanol sob concentrações semelhantes aos da *Saccharomyces* (FAGA et al., 2010; TOMÁS-PEJO et al., 2009). Estudos conduzidos por Wingren et al., (2003) obtiveram 2,6% (w/v) de etanol, onde segundo Kuloyo (2012) é um percentual não aceitável no processo econômico. Neste estudo, as concentrações de etanol estiveram acima de 5g.L⁻¹.

A representação dos rendimentos de fermentação das amostras F-Sc, F-Km e F-SK, F1, F2 e F3 respectivamente, apresentam valores próximos. Entretanto, sabe-se que os rendimentos do processo não podem ultrapassar o valor de 51,1%, diante dos resultados deste estudo, mesmo sendo considerados aceitáveis, torna necessário ampliar o estudo de pré-tratamento ácido e hidrólise a fim de se obter maiores rendimentos de fermentação. As concentrações de ART foram próximas, dessa forma, os meios de culturas para fermentação foram praticamente similares em termos de açúcares para seguirem essa etapa e, por conseguinte, serem assimilados pelas leveduras.

Estratégias para aumentar a produção de etanol com base nesses experimentos incluem realizar um planejamento experimental de hidrólise enzimática e fermentação para se conhecer o início da inibição após a etapa de pré-tratamento ácido, visto que é a partir desse procedimento que surgem à formação dos contaminantes.

5 CONCLUSÃO

As leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentam o mesmo desempenho fermentativo para produção de álcool utilizando biomassa pré-tratada de *Opuntia ficus-indica*.

REFERÊNCIAS

- ABUD, A. K. S. **Estudo do comportamento cinético e da estabilidade de uma linhagem recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de fermentação alcoólica de amiláceos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo. 1997.
- AL-KOSSORI, R. L. et al. Composition of pulp, skin, and seeds of prickly pear fruit (*Opuntia ficus indica* sp.). **Plant Foods Hum. Nutr.** 52: 263–270. 1998.
- ALVES, M. **Estudo de sistema de cogeração em usina de açúcar e álcool, com utilização do bagaço e palha de cana**. 114 f. Dissertação de mestrado, UNICAMP – Campinas, 2011.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Biotechnol Biofuels**, 101:4851–61, 2010.
- ANDRADE, L. M. F; DINIZ, K. M. **Impactos ambientais da agroindústria de cana-de-açúcar: subsídios para a gestão**. 2007. 1087 f. Monografia (Especialização em Gerenciamento Ambiental) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2007.
- ANNUNCIADO, T. R. **Estudo da *Chorisia speciosa* e outras fibras vegetais como sorventes para o setor de petróleo**. 120p. Dissertação de Mestrado – Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- APPA (Asociación de Productores de Energías Renovables - *Renewable Energies Producers Association*). Biocarburantes y Desarrollo Sostenible. Mitos y Realidades. **APPA Document**. 2007.
- ARANTES, V; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, Athens, v. 3, n. 4, p. 1-11, 2010.
- ARO, N. N; PAKULA, T; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 719-739, Sept. 2005.
- AYALA, B. T. **Proyecto de instalación de una planta de procesamiento de tuna en el distrito de Chincho**. Provincia de Angaraes, departamento de Huancavelica (Perú). Chem. Eng. Thesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. 2008.
- BALAT, M; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. **Appl Energ.** 86: 2273-2282. 2009.
- BALAT, H. Prospects of biofuels for a sustainable energy future: A critical assessment. **Energy Educ Sci Technol Part A**, 24:85–111. 2010.

BENHURA, M. A. N; CHIDEWE, C. Characterization of the polysaccharide material that is isolated from the fruit of *Cordia abyssinica*. **Afr J Biochem Res.** 5: 95-101. 2011.

BIANCHI, M. L. **Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolv.** 1995. 87 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

BRASKEM. O ETANOL. <Disponível em: <http://www.braskem.com.br/site.aspx/Etanol>. Acesso em 05 de Março de 2015.

CANILHA, L. et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. N° 44: 48-54, **Revista Analytica**, Dezembro 2009/Janeiro2010.

CARDONA, C. A; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresour Technol.** 98: 2415-2457. 2007.

CARMO, J. R. **Produção de etanol e pectinase por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 utilizando resíduos do processamento do café (*Coffea arabica* L.).** 2013. 254 p. Tese (doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2013.

CARVALHO, G. B. et al. Comparison of different procedures for the detoxification of eucalyptus hemicellulosic hydrolysate for use in fermentative processes. **J Chem Technol Biotechnol.** 81: 152-157. 2006.

CASTRO, A. M; PEREIRA, Jr. N. Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHAMPAGNE, P. Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues: A Canadian perspective: Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues in Canada. **Resour Conserv Recy.** 50: 211-230. 2007.

CHANG, M. C. Harnessing energy from plant biomass. **Curr Opin Chem Biol.** 11: 677-684. 2007.

CLAASSEN, P. A. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. **Appl Microbiol Biotechnol.** 52: 741-755. 1999.

CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade.** São Paulo, Blucher, 2010.

COSTA, D. A. **Caracterização de leveduras termotolerantes para produção de etanol celulósico.** 2011. 73 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

COTTA, J. A. O. et al. Validação do método para determinação de nitrogênio Kjeldahl total. **Revista analítica**, n°. 26, 2007.

DURU, B; TURKER, N. Changes in physical properties and chemical composition of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) during maturation. **J. Prof. Assoc.** Cactus Dev. 2: 22–33. 2005.

DEMIRBAS, A. H; DEMIRBAS, I. Importance of rural bioenergy for developing countries. **Energy Convers Manage.** 48: 2386–98, 2007a.

DEMIRBAS, A; KARSLIOGLU, S. Biodiesel production facilities from vegetable oils and animal fats. **Energy Source.** 29: 133–41. 2007b.

DEMIRBAS, A. Competitive liquid biofuels from biomass. **Appl Energy**, 88:17–28, 2011.

DYR, J. S. van; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, Nov. 2012.

EISENTRAUT, A. Sustainable production of second-generation biofuels – potential and perspectives in major economies and developing countries. **IEA Bioenergy Task**, 39. <<http://www.task39.org/LinkClick.aspx?fileticket=qSaJfQivns%3d&tabid=4426&language=en-US.2010>>.

EU (European Commission). Directive 2009/28EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the promotion of the use of energy from renewable sources. **Official Journal of the European Union.** 2009.

FAGA, B. A; WILKINS, M. R; BANAT, I. M. Ethanol production through Simultaneous Saccharification and Fermentation of switchgrass using *Saccharomyces cerevisiae* D5A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains, **Bioresour Technol.** 101, 2273–2279, 2010.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure and Reactions.** Berlin, Walter de Gruyter, 613 p. 1989.

FERNÁNDEZ, J. Agroenergética, un motor del desarrollo agrario sostenible. **Vida Rural**, 272: 17–21, 2008.

FOFANA, I; CHITIGA, M; MABUGU, R. Oil prices and the South African economy: A macro-meso-micro analysis. **Energ Policy.** 37: 5509–5518. 2009.

FONECA, G. G. et al. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 330–354, 2008.

GALBE, M; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Adv Biochem Eng Biotechnol.** 108: 41–65. 2007.

GARCÍA-APRÍCIO, M. P. et al. Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 136–140, n. 1–12, p. 353–365, Apr. 2007.

GINESTRA, G. et al. Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficusindica* (L.) Mill.]. **J Agric Food Chem**, 57, 10323-10330. 2009.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresour Technol**. 101:4775–800, 2010.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n.2, p.374-381, 2007.

GOYCOOLEAL, F. M; CÁRDENAS, A. Pectins from *Opuntia* spp.: A short review. **J Prof Assoc Cactus**. 5: 17-29, 2003.

GROHMANN, K; CAMERON, R. G; BUSLIG, B. S. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. **Bioresour Technol**, 53, 129-141, 1995.

GRAY, K. A; ZHAO, L; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Curr Opin Chem Biol**, 10:141–6, 2006.

GUPTA, R; SHARMA, K. K; KUHAD, R C. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol using *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* NCIM 3498. **Bioresour Technol**. 20: 100:1214. 2009.

GUPTA, R. et al. Fungal delignification of lignocellulosic biomass improves the saccharification of celluloses. **Biodegradation**, 22:797–804. 2011.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends Biotechnol**. 24: 549-556. 2006.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Appl Microbiol Biotechnol**. 74, 937-953. 2007a.

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

HSU, T. A. Pretreatment of Biomass. In *Handbook on bioethanol: production and utilization*, p. 179. Edited by C. E. Wyman. Washington, DC: Taylor & Francis. 1996.

JAY, J. C; GOVINDA, R. T. Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review. **Renewable Energy**, v. 36, n. 12, p. 3541-3549, Dec. 2011.

JAYANI, R. S; SAXENA, S; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, Rickmansworth, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.

KLINKE, H. B; THOMSEN, A. B; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Appl Microbiol Biotechnol**. 66: 10-26. 2004.

- KUHAD, R. C. et al. Bioethanol production from *Lantana camara* (red sage): pretreatment, saccharification and fermentation. **Bioresour Technol.** 101:8348–54. 2010.
- KULOYO, O. O. et al. *Opuntia ficus-indica* cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **World J Microbiol Biotechnol** 30:3173–3183. 2014.
- KULOYO, O. O. **Ethanol production by yeast fermentation of an *Opuntia ficus-indica* biomass hydrolysate.** 174 p. Dissertação de Mestrado. Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Department of Microbial, Biochemical and Food Biotechnology, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa. 2012.
- KUMAR, R; SINGH, S; SINGH, O. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **J Ind Microbiol Biotechnol.** 35: 377-391. 2008.
- KUMMAR, R; WYMAN, C. E. Effect of xylanase supplementation of cellulose on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. **Bioresour Technol.** v. 100, n. 18, p. 4203-4213, 2009.
- KUYPER, M. et al. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Res.** 5: 925-934. 2005b.
- LANE, M. M; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, n. 1-2, p. 17-26, 2010.
- LEAL, L.C. et al. Substituição da palma-gigante por palma-miúda em dietas para bovinos em crescimento e avaliação de indicadores internos. **Revista Brasileira de Zootecnia.** 38: 2264–2269. 2009.
- LEHNINGER, A. L et al. **Lehninger princípios de bioquímica.** 4. ed. São Paulo: Sarvier. XXVIII, 1202 p. 2006.
- LEITE, M. L. M. V. **Palma forrageira (*Opuntia ficus indica* e *Nopalea cochenillifera*).** Universidade Federal da Paraíba – UFPB / Centro de Ciências Agrárias – CCA. Grupo de pesquisa Lavoura Xerófila – GPLX. Areia – PB/ Julho, 2006.
- LIRA, M. A. et al. Utilização da palma forrageira na pecuária leiteira do semiárido. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, Recife, v. 2, p. 107-120, 2005. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/34528/1/AAPCAV2-Revisao-03.pdf>>. Acesso em: 07 jan. 2015.
- LUBBE, N; SAHLIN, U. Benefits of biofuels in Sweden: a probabilistic re-assessment of the index of new cars' climate impact. **Appl Energy**, 92:473–9, 2012. ROLLIN, J. A et al. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: a comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. **Biotechnol Bioeng**, 108:22–30, 2011.
- MACEDO, L. A; ROUSSET, P. L. A; VALE, A. T. Influência da composição da biomassa no rendimento em condensáveis da torrefação de resíduos vegetais. **Pesq. Flor. Bras**, Colombo, v. 34, n. 80, p. 417-434. 2014.

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

MODIG, T; LIDÉN, G; TAHERZADEH, M. J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochem J.** 363: 769-776. 2002.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour Technol.** 96: 673-686. 2005.

MOUCO, J. T. **Mudanças climáticas de biocombustíveis: a experiência brasileira do etanol como recurso energético alternativo.** 2011. 134 p. Dissertação (Mestrado em Relações Internacionais) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

MOURA, M. S. B. et al. Aptidão do Nordeste brasileiro ao cultivo da palma forrageira sob cenários de mudanças climáticas. In: SIMPÓSIO DE MUDANÇAS CLIMÁTICAS E DESERTIFICAÇÃO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO, 3, 2011, Juazeiro. **Experiências para mitigação e adaptação**; anais. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2011. 1 CD-ROM. (Embrapa Semiárido. Documentos, 239). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/51605/1/Magna4.pdf>>. Acesso em: 07 jan. 2015.

NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento alcalino (NAOH) do bagaço da cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros.** Dissertação de Mestrado, UFSCar, São Paulo – SP. 138f. 2011.

NETO, A. B. T. **Estudo da pré-hidrólise ácida da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill).** 2010. 41 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, Campina Grande, PB, 2010.

NOGUEIRA, A. M. P; VENTURINI-FILHO, W. G. Aguardente de cana. Botucatu: UNESP/Faculdade de Ciências Agrônomicas, 2005. Disponível em: <http://dgta.fca.unesp.br/docentes/waldemar/aguardente/Aguardente.pdf>. Acesso em 15 de Janeiro de 2015.

NYKO, D. et al. A corrida tecnológica pelos biocombustíveis de segunda geração: uma perspectiva comparada, **BNDES Setorial** 32, p. 5-48. 2014.

OGEDA, T. L; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1-10, 2010.

OHGREN K, et al. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. **J Biotechnol**, 126(4):488-98. 2006

OLSSON, L; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme Microb Technol** 18: 312-331. 1996.

- PALMQVIST, E; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresour Technol.** 74: 17-24. 2000a.
- PALMQVIST, E; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresour Technol.** 74: 25-33. 2000b.
- PELCAR, JR. M.J; CHAN, E. C. S; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** 2. ed. São Paulo: Makron Books do Brasil, 1996.
- PEREIRA, Jr. N; COUTO, M. A. P. G; SANTA ANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In **Series on Biotechnology**, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 45 p. 2008.
- PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int Microbiol.** 5: 53-63. 2002.
- PERLACK, R. D; STOKES, B. J. U.S. billion-ton update: biomass supply for a bioenergy and bioproducts industry. **USDo Energy.** Oak Ridge, TN, Oak Ridge National Laboratory: 227, 2011.
- PISKUR, J. et al. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends Genet** 22: 183-186. 2006.
- PRASAD, S; SINGH, A & JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Resour Conserv Recy.** 50: 1-39. 2007.
- QUILHÓ, L. F. T. L. **Produção de bioetanol a partir de materiais lenho-celulósicos de sorgo sacarino: revisão bibliográfica.** 88. P. 2011. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia) - Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, 2011.
- RAGAUSKAS, A. J. et al. The path forward for biofuels and biomaterials. **Science.** 311: 484-489. 2006.
- RAMOS, J. P. F. et al. Crescimento vegetativo de *Opuntia ficus-indica* em diferentes espaçamentos de plantio. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 3, p. 41-48, 2011.
- ROLLIN, J. A. et. al. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: a comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. **Biotechnol Bioeng.** 108: 22-30, 2011.
- RUEGGER, M. J. S; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da estação ecológica de Jureia-Itatins. São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.
- SÁNCHEZ, J. et al. Assessment of the bioethanol potential of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) biomass obtained from regular crops in the province of Almeria (SE Spain). **Israel Journal of Plant Sciences.** Vol. 60, pp. 301-318, 2012.
- SÁNCHEZ, O. J; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresour Technol.** 99: 5270-5295. 2008.

SANTOS, M. S.R. **Estudo de pré-tratamentos da palha e sabugo do milho visando a produção de Etanol 2G**. Dissertação de mestrado. Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL, 2014.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, vol.XY, N°.00, 1-7, 2012.

SILVA, C. C. F; SANTOS, L. C. Palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) como alternativa na alimentação de ruminantes (Forage palm (*Opuntia ficus-indica* Mill) as alternative in ruminant feeding). *Revista Electrónica de Veterinária*, v. VIII, n. 5, 1695-7504, 2007.

SILVA, A. P. et al. Optimal heat exchanger network synthesis using particle swarm optimization. **Optimization and Engineering** (Prin), v. 11, p. 459-470, 2010.

SILVA, N. L. C. **Produção de Bioetanol de Segunda Geração a Partir de Biomassa Residual da Indústria de Celulose**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química, Rio de Janeiro, 109 f. 2010.

SILVA, L; da. **Estudo da hidrólise enzimática em alta consistência de materiais lignocelulósicos**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná – Curitiba. 2012.

STINTZING, F. C; CARLE, R. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. **Mol Nutr Food Res**. 49: 175-194. 2005.

SUN, Y; CHENG, J. Hidrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Biores Technol**. 83, 1-11. 2002.

TAHERZADEH, M. J. et al. Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. **Ind Eng Chem Res**. 36: 4659-4665. 1997.

TAHERZADEH, M. J; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, Essex, v. 2, n. 3, p. 472-499, 2007a.

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

TAHERZADEH, M. J; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **Int J Mol Sci**. 9: 1621-1651. 2008.

TEIXEIRA, L. C; LINDEN, J. C; SCHROEDER, H. A. Simultaneous Saccharification and Cofermentation of peracetic acid-pretreated biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, n. 1-9, p. 111-127. 2000.

TÍMÁR-BALÁZSY, A; EASTOP, D. Chemical Principles of Textile Conservation utterworth Heinemann, Oxford, UK: Butterworth- Heinemann. **Trends in biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549-56, 1998.

TOIVARI, M. H. et al. Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol.** 70: 3681-3686. 2004.

TOMÁS-PEJÓ, E. et al. Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a Simultaneous Saccharification and Fermentation fed-batch process. **Fuel** 88, 2142-2147. 2009.

VAN MARIS, A. et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek.** 90: 391-418. 2006.

VIEIRA, E.L. et al. Effects of hay inclusion on intake, in vivo nutrient utilization and uminal fermentation of goats fed spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* Mill.) based diets. **Anim. Feed Sci. Technol.** 141: 199–208. 2008.

WACKETT, L. P. Microbial-based motor fuels: science and technology. **Microb Biotechnol.** 1: 211-225. 2008.

WINGREM, A; GALBE, M; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnol Progr,** 19, 1109-1117. 2003.

WOLF, L. D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-deaçúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros.** 148 p. Dissertação de mestrado – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011;

ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product biorefineries. **J Ind Microbiol Biotechnol.** 35: 367–75. 2008.