



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIA DA**  
**BIOMASSA**



**JUMELICE DOS SANTOS SILVA**

**ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E FERMENTABILIDADE EM RESÍDUOS**  
**LIGNOCELULÓSICOS DE *MANIHOT ESCULENTA* PARA A PRODUÇÃO DE**  
**BIOCOMBUSTÍVEL**

**Rio Largo – AL**

**2017**

**JUMELICE DOS SANTOS SILVA**

Estudo da hidrólise enzimática e fermentabilidade em resíduos lignocelulósicos de *Manihot esculenta* para a produção de biocombustível

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

Orientadora: Profa. Dra. Renata Maria Rosas Garcia Almeida

Coorientadora: Profa. Dra. Valéria Rodrigues dos Santos Malta

**Rio Largo – AL**

**2017**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

M929u Silva, Jumelice dos Santos.  
Estudo da hidrólise enzimática e fermentabilidade em resíduos lignocelulósicos de *Manihot esculenta* para a produção de biocombustível / Jumelice dos Santos Silva. – 2017.  
62 f. : il.

Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.  
Coorientadora: Valéria Rodrigues dos Santos Malta.  
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, 2017.

Bibliografia: f. 53-61.

1. Biomassa. 2. *Manihot esculenta*. 3. Etanol de segunda geração. 4. Hidrólise enzimática. I. Título.

CDU: 661.722

## TERMO DE APROVAÇÃO

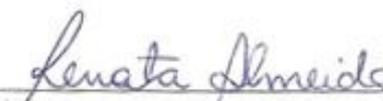
JUMELICE DOS SANTOS SILVA

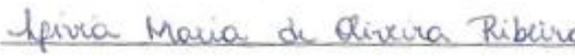
### ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E FERMENTABILIDADE EM RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE *MANIHOT ESCULETA*, PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL

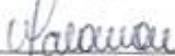
Esta dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre Profissional em Energia da Biomassa, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas.

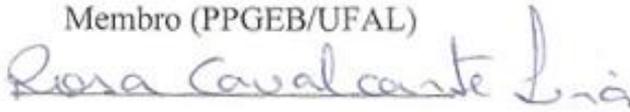
A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Aprovado em 04/01/2017

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Renata Maria Rosas Garcia Almeida  
Orientadora (PPGEB/UFAL)

  
\_\_\_\_\_  
Dr.<sup>a</sup>. Livia Maria de Oliveira Ribeiro  
Membro (CTEC/UFAL)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Karina Ribeiro Salomon  
Membro (PPGEB/UFAL)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Rosa Cavalcante Lira  
Membro (CECA/UFAL)

Rio Largo – AL

2017

Dedico este trabalho a minha mãe, Jovenil, que sempre acreditou em mim e me deu forças para superar toda e qualquer dificuldade da vida. Ao meu pai Manoel e aos meus irmãos, que são a fortaleza de minha alma. A todos da minha família por me amarem e serem meus amigos.

Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alagoas e ao Centro de Ciências Agrárias pelas condições de estudo.

Aos colegas e professores do Laboratório de Cristalografia e Modelagem Molecular – LabCriMM, por contribuírem com seus conhecimentos.

À orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Maria Rosas Garcia Almeida, meus agradecimentos pela oportunidade, sugestões e por todo o apoio. Além da confiança e paciência em mim depositadas.

À coorientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valéria Rodrigues dos Santos Malta, pelos trabalhos realizados em conjunto, pelas orientações desde a Iniciação Científica, pela amizade, além dos inúmeros conselhos que levarei para a vida.

À equipe do Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos – LTBA, pelo acolhimento, apoio e colaboração na realização dos experimentos.

Ao amigo Kledson Lopes Barbosa, pela disponibilidade de sempre, por estar presente em todos os momentos decisivos deste trabalho e por compartilhar seus conhecimentos com clareza e entusiasmo.

À amiga Sheyla Welma Duarte Silva, por todo o apoio, carinho, orientações nas decisões da vida e principalmente pela motivação.

A todos os meus amigos que participaram direta ou indiretamente de minha formação e desta etapa da minha vida, que me fizeram acreditar e que compartilham comigo agora a alegria por ter chegado ao fim, os meus sinceros agradecimentos.

“A farinha é feita de uma planta da família das  
euforbiáceas, euforbiáceas  
de nome *manihot utilissima* que um tio meu apelidou de macaxeira  
e foi aí que todo mundo achou melhor!...  
a farinha tá no sangue do nordestino  
eu já sei desde menino o que ela pode dar  
e tem da grossa, tem da fina se não tem da quebradinha  
vou na vizinha pegar pra fazer pirão ou mingau  
farinha com feijão é animal!  
o cabra que não tem eira nem beira  
lá no fundo do quintal tem um pé de macaxeira  
a macaxeira é popular é macaxeira pr`ali, macaxeira pra cá  
e em tudo que é farinhada a macaxeira tá  
você não sabe o que é farinha boa  
farinha é a que a mãe me manda lá de Alagoas.”

(Farinha, de Djavan)

## RESUMO

O uso de combustíveis fósseis vem causando impactos negativos no equilíbrio do meio ambiente com altos índices de poluição, haja vista a liberação de altas concentrações de gases poluentes na atmosfera. Em virtude das crescentes necessidades de minimizar o consumo de combustível de origem fóssil, e a busca incessante por fontes alternativas geradoras de energia limpa, surge como alternativa o uso da biomassa lignocelulósica para produção do etanol de segunda geração. Um dos grandes desafios nesse processo é a conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis, bem como, alcançar um alto rendimento na fermentação destes. Neste âmbito, o presente trabalho teve como objetivo propor um estudo preliminar do aproveitamento de resíduos da mandioca mansa (*Manihot esculenta*), visando à produção de biocombustível como uma perspectiva futura. Na primeira etapa deste estudo, foi realizada a caracterização química da biomassa, o que possibilitou a verificação dos componentes constituintes das amostras analisadas: celulose, hemicelulose, lignina, proteínas, extrativos e cinzas. Na sequência, foram obtidos os carboidratos liberados através da hidrólise enzimática dos polímeros. Tais açúcares foram quantificados em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) e posteriormente foram submetidos a processo de fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*. Com os resultados obtidos, foi possível observar que a composição média do polissacarídeo celulose tem maior representatividade na casca, com 36,12%, seguido pelo caule que apresentou constituição de 21,52%, e por último na folha cujo percentual foi de apenas 8,59%. No entanto, a comparação dos perfis de biotransformação de celulose em glicose, mostrou que os resíduos casca e caule apresentaram valores bem próximos (5,80 g/L e 5,56 g/L, respectivamente). Já para a produção máxima de etanol a partir da fermentação, foi verificado que, mesmo apresentando um teor de glicose inferior ao da casca, o caule se mostrou superior no rendimento final (caule = 5,57 g/L; casca = 5,21 g/L). Uma vez que nele foi constatado um percentual maior de hemicelulose, e conseqüentemente, uma concentração maior de xilose, fatores contribuintes para o incremento na produção de etanol. Com base no elevado teor de carboidratos verificado, e considerando os rendimentos alcóolicos obtidos a partir dos resíduos da biomassa *Manihot esculenta*, foi possível verificar que tanto o caule, quanto a casca apresentaram valores representativos, o que torna ambos fortes candidatos frente à produção de etanol 2G.

**Palavras-chave:** Biomassa. *Manihot esculenta*. Etanol de segunda geração. Hidrólise enzimática.

## ABSTRACT

The use of fossil fuels has been causing negative impacts on the equilibrium of the environment with high levels of pollution, in view of the release of high concentrations of polluting gases in the atmosphere. Due to the growing need to minimize fossil fuel consumption and the constant search for alternative sources of clean energy, the use of lignocellulosic biomass for the production of second generation ethanol appears as an alternative. One of the great challenges in this process is the conversion of the lignocellulosic biomass to fermentable sugars, as well as, to reach a high yield in the fermentation of these. In this context, the objective of this work was to propose a preliminary study of the use of cassava residues (*Manihot esculenta*), aiming at the production of biofuel as a future perspective. In the first stage of this study, the chemical characterization of the biomass was carried out, which allowed the verification of the constituent components of the analyzed samples: cellulose, hemicellulose, lignin, proteins, extractives and ashes. Carbohydrates released through the enzymatic hydrolysis of the polymers were then obtained. These sugars were quantified in a High Efficiency Liquid Chromatograph (HPLC) and were subsequently submitted to a fermentation process with *Saccharomyces cerevisiae*. With the obtained results, it was possible to observe that the average composition of the polysaccharide cellulose has greater representativeness in the bark, with 36.12%, followed by the stem that constituted 21.52%, and finally in the leaf whose percentage was only 8.59. However, the comparison of the biotransformation profiles of cellulose to glucose showed that the bark and stem residues presented very close values (5.80 g / L and 5.56 g / L, respectively). As for the maximum ethanol production from the fermentation, it was verified that even though it had a lower glucose content than the bark, the stem was higher in the final yield (stem = 5.57 g / L, bark = 5.21 g / L). As it was observed a higher percentage of hemicellulose, and consequently a higher concentration of xylose, contributing factors for the increase in ethanol production. Based on the high carbohydrate content observed, and considering the alcoholic yields obtained from the residue of the biomass *Manihot esculenta*, it was possible to verify that both the stem and the bark presented representative values, which makes both strong candidates against the production of 2G ethanol .

**Keywords:** Biomass. *Manihot esculenta*. Second generation ethanol. Enzymatic hydrolysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Fluxograma da produção de etanol 1G a partir da cana-de-açúcar.....	16
Figura 2 –	Representação das etapas de produção do etanol de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica.....	18
Figura 3 –	Partes principais da mandioca.....	19
Figura 4 –	Variação percentual da produção de <i>Manihot esculenta</i> – comparação set. 2016/2015.....	20
Figura 5 –	Mapa da produção de mandioca (t) em Alagoas.....	21
Figura 6 –	Representação da estrutura da biomassa lignocelulósica indicando a disposição dos polissacarídeos celulose, hemicelulose e lignina.....	22
Figura 7 –	Estrutura da celulose com suas regiões ordenadas de celobiose.....	23
Figura 8 –	Representação esquemática da hemicelulose.....	23
Figura 9 –	Estrutura geral da lignina apresentando seus resíduos fenólicos.....	24
Figura 10 –	Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico.....	26
Figura 11 –	Representação das enzimas do complexo celulolítico e estruturas tridimensionais: a) celulases; b) endoglucanase em complexo com celotetraose (Cod. Pdb 5I79) c) exoglucanases em complexo com celohexose e celobiose (Cod. Pdb 7CEL; d) $\beta$ -glicosidase em complexo com celobiose (Cod. Pdb 2RFY); e) $\beta$ -glicosidase em complexo com glicose (Cod. Pdb 5K6M).....	27
Figura 12 –	Fluxograma das etapas envolvidas no estudo da hidrólise enzimática e fermentabilidade em resíduos lignocelulósicos de <i>Manihot esculenta</i> .....	30
Figura 13 –	Curva padrão de glicose.....	37
Figura 14 –	Perfil da biotransformação do caule (a) e casca (b) de <i>Manihot esculenta</i> em açúcares fermentescíveis quantificados em HPCL.....	43
Figura 15 –	Fermentabilidade das frações líquidas do hidrolisado do caule (a) e casca (b), rico em açúcares fermentescíveis ilustrados pelo rendimento etanólico g/L.....	45
Figura 16 –	Potencial produtivo de etanol de segunda geração (E2G) a partir dos resíduos não comestíveis de <i>Manihot esculenta</i> .....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Produção brasileira de mandioca em 2015.....	20
Tabela 2 –	Composição química da biomassa lignocelulósica.....	23
Tabela 3 –	Descrição de pré-tratamentos existentes.....	25
Tabela 4 –	Fatores e níveis estudados no planejamento experimental para a <i>Manihot esculenta</i> .....	36
Tabela 5 –	Valores codificados e valores “reais” para cada fator estudado da análise do pré-tratamento ácido.....	36
Tabela 6 –	Composição química dos resíduos de <i>Manihot esculenta</i> desidratados.....	39
Tabela 7 –	Matriz de planejamento: Resultados do pré-tratamento ácido da casca da <i>Manihot esculenta</i> em resposta aos açúcares presentes na fração líquida.....	41
Tabela 8 –	Valores reais dos monossacarídeos, glicose e xilose, a partir dos resíduos (casca e caule) de <i>Manihot esculenta</i> após hidrólise enzimática.....	42
Tabela 9 –	Cinética do consumo dos carboidratos e produção de etanol a partir das frações líquidas do hidrolisado do caule e casca de <i>Manihot esculenta</i> .....	46

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Geral.....	14
2.2	Específicos.....	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1	Combustível fóssil.....	15
3.2	Etanol de primeira geração (E1G).....	15
3.3	Etanol de segunda geração (E2G).....	17
3.4	<i>Manihot esculenta</i> .....	19
3.5	Estruturas químicas e pré-tratamentos empregados na biomassa lignocelulósica visando à produção de etanol.....	22
3.6	Hidrólise enzimática.....	25
3.7	Fermentação etanólica.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	Matéria prima.....	31
4.2	Higienização, secagem e trituração dos resíduos de <i>Manihot esculenta</i> .....	31
4.3	Caracterização química dos resíduos desidratados de <i>Manihot esculenta</i> .....	31
4.3.1	Determinação de umidade.....	31
4.3.2	Determinação de proteínas.....	31
4.3.3	Determinação de extrativos.....	32
4.3.4	Determinação de lignina insolúvel na fração sólida.....	33
4.3.5	Determinação de lignina solúvel.....	34
4.3.6	Determinação de carboidratos.....	34
4.3.7	Determinação de cinzas.....	35
4.4	Pré-tratamento com ácido sulfúrico.....	35
4.5	Atividade enzimática.....	37
4.6	Hidrólise enzimática.....	38
4.7	Fermentação etanólica.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1	Composição química dos resíduos de <i>Manihot esculenta</i> .....	39

<b>5.2</b>	<b>Pré-tratamento com ácido sulfúrico.....</b>	<b>41</b>
<b>5.3</b>	<b>Hidrólise enzimática.....</b>	<b>41</b>
<b>5.4</b>	<b>Fermentação.....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>PEDIDOS DE DEPÓSITOS DE PATENTES.....</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, o aumento dos preços mundiais de combustíveis fósseis promoveu uma elevação no preço de derivados do petróleo no mundo. Além disso, o uso desses produtos é um dos maiores responsáveis por impactos negativos causados ao meio ambiente, devido sua combustão incompleta, liberando, na atmosfera, monóxido de carbono (LIMA et al., 2013; SINGH et al., 2014). Estes problemas podem ser minimizados com o desenvolvimento das tecnologias de energia limpa (PANDEY, 2015; RENGSIRIKUL et al., 2013). Para Milanez et al. (2015, p. 238), “dentre as opções tecnológicas que vêm sendo desenvolvidas no Brasil, destacam-se as iniciativas dedicadas ao E2G (etanol de segunda geração), cujo impacto na produtividade pode significar um aumento de até 50% em relação ao nível atual”.

Por essas razões, houve um grande despertar para o desenvolvimento de processos visando à produção dos biocombustíveis oriundos de fontes alternativas (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; SHIM, 2015). Um exemplo desses biocombustíveis são os obtidos a partir de biomassa lignocelulósica cuja exploração e produção em escala industrial pode, futuramente, competir economicamente com o preço do combustível de origem fóssil e, por conseguinte, minimizar os impactos ambientais que estão associados à liberação de gases poluentes na atmosfera (SARKAR et al., 2012; EL-MASHAD, 2015).

Vale salientar, que a produção de combustíveis obtidos a partir de biomassa lignocelulósica vem crescendo devido ao fato de vários tipos dessas biomassas estarem presentes em grande quantidade, em quase todas as regiões do planeta, sendo a maioria representada por resíduos agroindustriais (KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016). Para Alvira (2010, p. 4851) “a biomassa, até agora, é o único material adequado e principal fonte de energia renovável para produzir combustíveis alternativos para uso em transporte (etanol ou biodiesel) em curto prazo”. A quantidade de material lignocelulósico presente na massa seca da biomassa, é um dos fatores a se considerar no uso desses resíduos, para a produção de etanol de segunda geração (MEJÍA; GUTIÉRREZ; EL-HALWAGI, 2012).

Considerando a expansão do mercado dos biocombustíveis de segunda geração, nota-se que as matérias-primas utilizadas no processo de produção do E2G são palha do milho (FAN et al., 2013), sabugo do milho (SANTOS, 2014; SILVA et al., 2015), palha da cana-de-açúcar (SANTOS et al., 2012), bagaço da cana-de-açúcar (SANTOS et al., 2010; MESA et al., 2011), palma forrageira (KULOYO et al., 2014; BARBOSA, 2015). Nessa perspectiva, a utilização de resíduos da mandioca (*Manihot esculenta*) para a produção de etanol, estaria

priorizando a ideia de sustentabilidade, auto dependência e expansão do mercado financeiro local, uma vez que, a região Nordeste é uma grande produtora dessa cultura, e consequentemente, geradora de grandes quantidades destes resíduos lignocelulósicos.

A motivação para a escolha de resíduos da mandioca no presente estudo foi baseada em seus volumes de produção no Brasil, sendo o País um dos maiores produtores mundiais dessa cultura com uma produção em torno de 25 milhões de toneladas por ano, na última década, o que representa 75% da produção da América do Sul (FAO, 2013). Tendo o estado de Alagoas destaque como um dos maiores produtores de mandioca do Nordeste. Outro fator importante a ser considerado, é que o uso desses resíduos frente à produção de biocombustível contribui para o desenvolvimento da agricultura familiar e evidencia ainda, uma destinação mais nobre e menos agressiva ao meio ambiente, minimizando os impactos negativos associados à disposição inadequada (KARIM; HUSSAIN; ZAIN, 2014; SOUZA, 2011).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos das partes não comestíveis de *Manihot esculenta*.

### 2.2 Específicos

- Obter a caracterização físico-química dos resíduos;
- Realizar o pré-tratamento químico dos resíduos;
- Avaliar o processo de hidrólise enzimática dos resíduos de *Manihot esculenta*;
- Quantificar a bioconversão dos resíduos lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis;
- Verificar o desempenho da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada no processo de fermentação etanólica;
- Determinar o teor alcóolico do mosto fermentado.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Combustível fóssil

Com participação de 80%, dos quais 36% de petróleo, 23% de carvão mineral e 21% de gás natural, a matriz energética mundial ainda é fortemente inclinada para as fontes de carbono fóssil (NUNES, et al., 2013; OGEDA; PETRI, 2010). O uso e exploração sem consciência desses combustíveis são alguns dos principais fatores que vem influenciando de forma negativa no equilíbrio do meio ambiente, assim sua utilização deve ocorrer de maneira responsável, evitando índices de poluição nos grandes centros urbanos que possam colocar em risco a saúde humana e o ecossistema terra (EMODI, 2014; LIMA et al., 2012).

No século XXI, a sociedade se depara com dois grandes desafios: a rápida expansão populacional no mundo, agora em 7,2 bilhões, com uma expectativa de aumento entre 33-71% até 2100; além de um potencial aumento na frequência e intensidade das secas, relacionados com a mudança climática global, em grande parte causada pelo uso de combustíveis de origem fóssil (COOK et al., 2014; DAI, 2013; GERLAND et al., 2014).

Além disso, ainda existe uma preocupação com a escassez e com o aumento do preço destas fontes não renováveis de energia (ALVIM et al., 2014; SHEIKH et al., 2013). Para completar, a combustão crescente de combustíveis fósseis e o desmatamento têm gerado, na atmosfera, acúmulo de gases poluentes, particularmente de CO<sub>2</sub>, responsáveis pelo efeito estufa e consequentes alterações climáticas. Assim, este quadro exige mudanças nos padrões de industrialização e de consumo da sociedade, reduzindo a emissão de gases de efeito estufa (AIGBODION et al., 2010; MOTONE et al., 2016).

#### 3.2 Etanol de primeira geração (E1G)

As matérias primas utilizadas na produção de biocombustível podem ser divididas em três classes: **a) sacaríneas**, assim denominadas por possuírem a sacarose, a qual dá origem ao álcool (cana-de-açúcar, sorgo sacarino (colmo), beterraba, sucos de frutas em geral, entre outros); **b) amiláceas**, cuja principal composição é o amido, dentre os quais, estão incluídos o milho, a mandioca, cereais de um modo geral, sorgo (grãos), batata e babaçu<sup>1</sup>; **c) celulósicas**, na qual etanol é produzido a partir dos açúcares presentes na celulose da biomassa. Temos

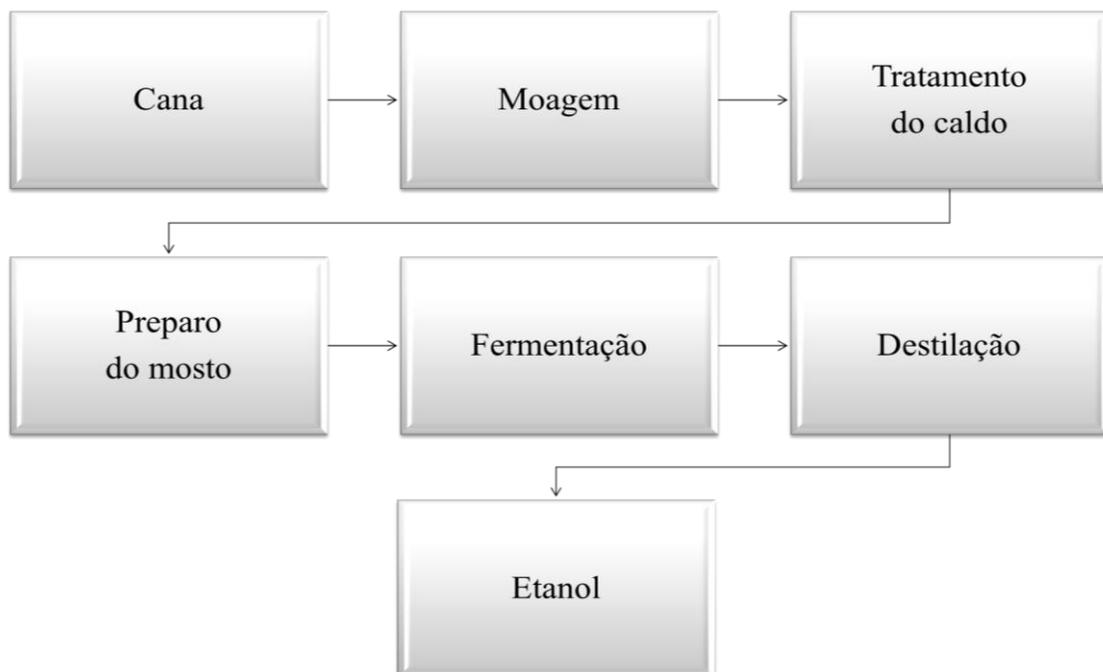
---

<sup>1</sup> Tipo de palmeira da família botânica *Arecaceae*, presente em diversos países da América Latina. No Brasil, seu uso é bastante difundido na Amazônia, na Mata Atlântica, no Cerrado e na Caatinga (CARRAZA; ÁVILA; SILVA, 2012).

como exemplo, o eucalipto, marmeleiro<sup>2</sup>, serragem, bagaço de cana, casca de arroz, palma forrageira, palha e sabugo de milho, (BARBOSA, 2015; SANTOS, 2014). No Brasil, o etanol (E1G) comercial é obtido através da fermentação do açúcar contido na cana-de-açúcar (SALLA et al., 2009), a partir de matérias-primas sacaríneas ou amiláceas, cana-de-açúcar e milho, respectivamente (HE et al., 2012).

Como se observa no fluxograma (Figura 1) até a obtenção do produto final que é o etanol em escala industrial, a cana passa por vários processos que vão desde a coleta da matéria prima no campo, passando por moagem para obtenção do caldo e posterior tratamento do mesmo. Em seguida, passa-se para as etapas de fermentação, destilação e determinação do teor alcóolico.

**Figura 1 - Fluxograma da produção de etanol 1G a partir da cana-de-açúcar**



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

A escolha da matéria-prima para produção do etanol 1G por via fermentativa irá depender da disponibilidade do cultivo em cada região, observando-se a sua viabilidade econômica e eficácia do processo. Segundo Lima (2001), Wenzel (2001) estas matérias-primas são classificadas em:

<sup>2</sup> *Cydonia oblonga* é uma pequena árvore, único membro do gênero *Cydonia*, da família Rosaceae, cujos frutos são chamados marmelos. É originário das regiões mais amenas da Ásia Menor e Sudeste da Europa (POTTER et al., 2007).

Matérias-primas açucaradas: Podem ser encontradas sobre duas formas, a) diretamente fermentescíveis por conter monossacarídeos (glicose); b) indiretamente fermentescíveis por conter dissacarídeos. Neste último caso, ocorre a sacarificação enzimática pelo microrganismo utilizado na fermentação. Dentre estas matérias-primas estão: cana-de-açúcar, beterraba açucareira, sorgo sacarino, milho sacarino entre outros (OLIVEIRA; BATISTA, 2015).

Matérias-primas amiláceas e feculentas: passam a ser diretamente fermentescíveis, após processo de hidrólise enzimática e/ou ácida, resultando na formação de monossacarídeos. Na utilização desse processo, costuma-se empregar fungos dos gêneros *Aspergillus*. Exemplos de amiláceas: os cereais como cevada, arroz, milho, sorgo; e de feculentas: batata, batata-doce, mandioca (OLIVEIRA; BATISTA, 2015).

Matérias-primas celulósicas: também não são diretamente fermentescíveis. Necessitam do processo de sacarificação para a quebra dos polímeros hemicelulose em açúcares fermentescíveis. São exemplos de matérias celulósicas: as palhas e madeiras; resíduos agrícolas como cascas, caroços, sabugos; resíduos de fábricas de papéis (OLIVEIRA; BATISTA, 2015).

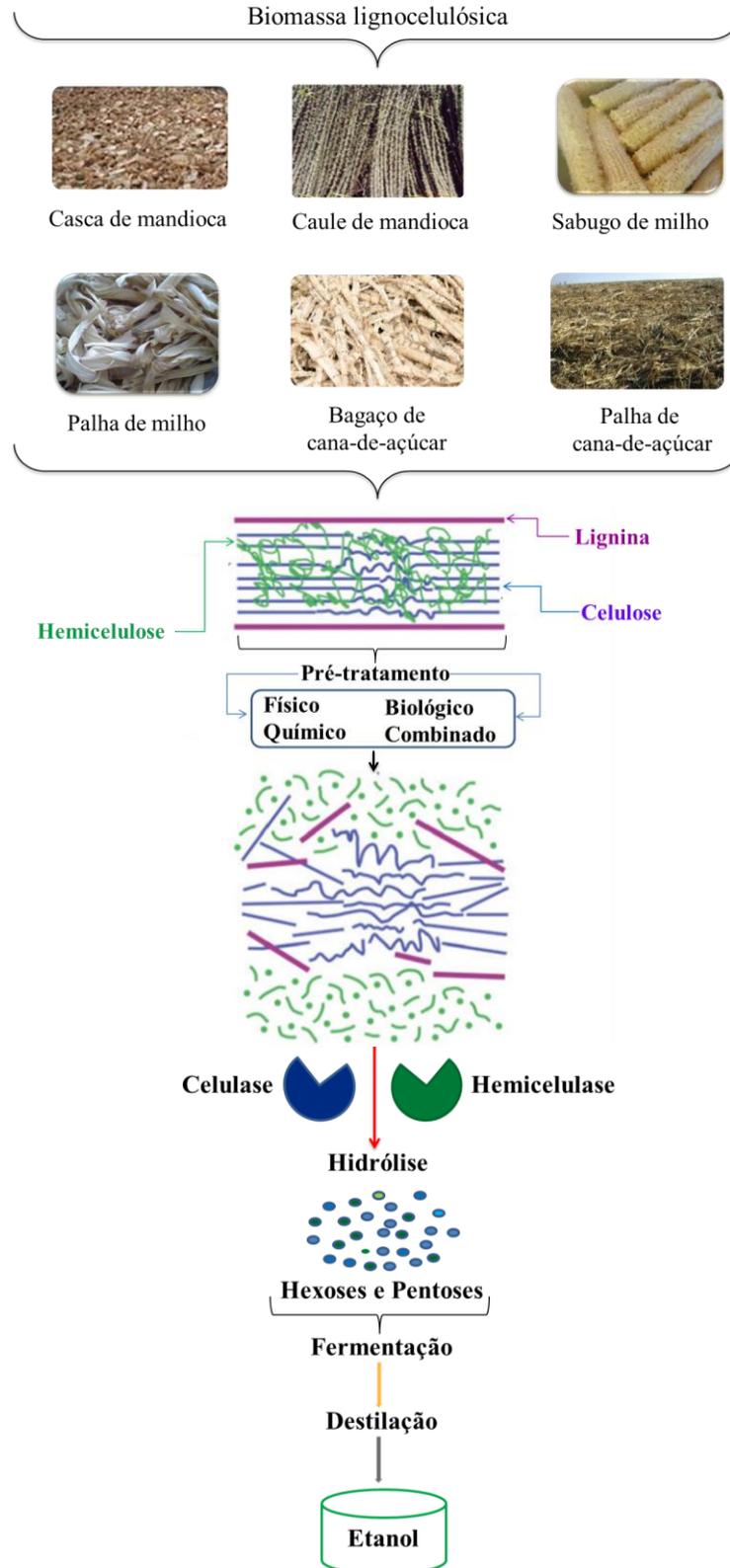
### **3.3 Etanol de segunda geração (E2G)**

O que difere os biocombustíveis de primeira e segunda geração é o tipo de matéria-prima utilizada nos processos de obtenção do etanol. Nos de primeira geração, por exemplo, utilizam a sacarose encontrada nos colmos da cana-de-açúcar, a glicose do amido do milho, e os de segunda geração utiliza a celulose dos materiais lignocelulósicos (LENNARTSSON; ERLANDSSON; TAHERZADEH, 2014). As fontes mais comuns são madeiras, resíduos agrícolas e agroindustriais, fibras vegetais, plantas aquáticas, gramíneas e outras substâncias vegetais (ANWAR, 2014).

O processo de produção de E2G (Figura 2) difere do processo de obtenção E1G, haja vista as distintas matérias-primas e disponibilidades dos açúcares fermentescíveis (BALAT, 2011; PITARELO et al., 2012). A biomassa utilizada na produção do E2G requer uma etapa de pré-tratamento, quando usualmente se utiliza ácido diluído para desconstruir os polímeros de celulose, hemicelulose e lignina (MOOD et al., 2013; SINGH, 2014). É nessa etapa que se obtém a fração líquida, contendo as pentoses que podem ser diretamente fermentadas para obtenção do etanol, e na fração sólida, obtém-se um material rico em celulose, cuja disponibilidade dos açúcares é dependente da hidrólise enzimática para libertar os açúcares

que serão convertidos em etanol pelos microrganismos na fermentação (SARKAR et al., 2012).

**Figura 2 - Representação das etapas de produção do etanol de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica**



Fonte: Adaptado de ASGHER et al., 2014.

### 3.4 *Manihot esculenta*

*Manihot esculenta* é, popularmente, conhecida por aipim, macaxeira ou mandioca cujo nome é de origem tupi (mani'oka). Pertencente à classe das Dicotiledôneas, à ordem Euphorbiales, à família Euphorbiaceae, ao gênero *Manihot* e à espécie *Manihot esculenta* subsp *esculenta*. O gênero *Manihot* é composto por cerca de 98 espécies (ORLANDINI; LIMA, 2014). Das culturas alimentícias, demonstra-se ser um dos poucos cultivos resistentes às mais adversas condições climáticas (FIORDA et al., 2013; GOEDERT, 2011). A *Manihot esculenta* é constituída de folhas verdes, caule e raízes, como mostra a figura 3.

**Figura 3 – Partes principais da mandioca**



Fonte: Adaptado de Ministério de Minas e Energia - EPE, 2014.

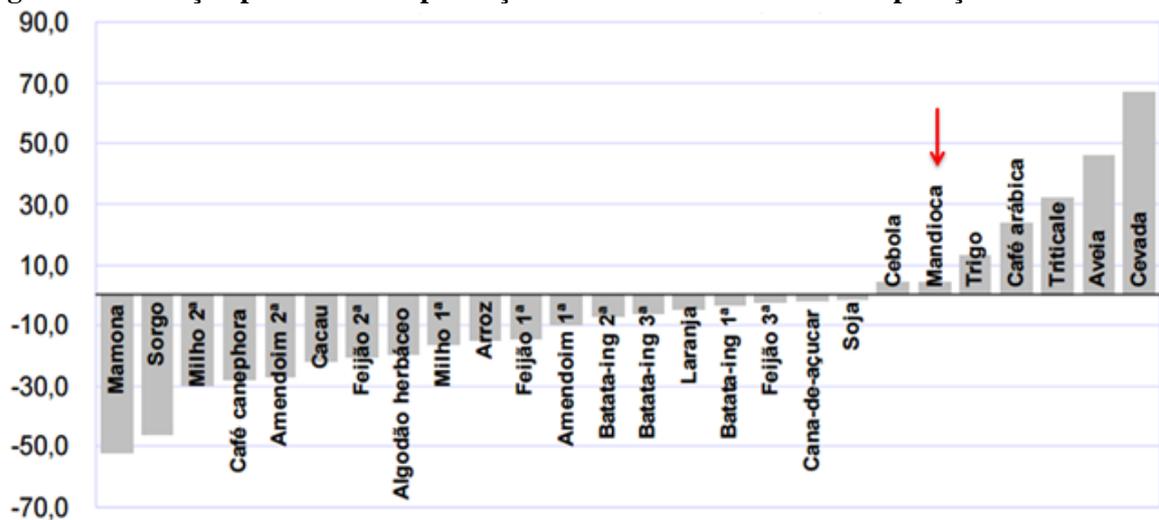
Dentre as principais características da *Manihot esculenta* estão a capacidade de armazenar grandes quantidades de amido em suas raízes e a fácil propagação vegetativa (SILVA et al., 2012). O cultivo da mandioca está presente em todos os estados do Brasil. A maior concentração ocorre nos estados do Norte, cuja região representa aproximadamente 33% da produção nacional (Tabela 1). Para o ano de 2015, dentre os vinte e seis principais produtos da agricultura brasileira, sete apresentaram variação percentual positiva na estimativa de produção em relação ao ano anterior, dentre os quais a mandioca com um aumento de 4,3% (Figura 4) (IBGE, 2016).

**Tabela 1 – Produção brasileira de mandioca em 2015**

Região fisiográfica	Área colhida (ha)	Quantidade produzida (t)	Rendimento médio (kg/ha)	Participação na produção (%)
Norte	501.246	8.037.507	16,31	33,8
Nordeste	555.840	5.668.126	9,53	24,0
Sudeste	131.004	2.524.993	17,94	10,1
Sul	229.388	5.583.682	23,85	25,6
Centro-Oeste	77.020	1.427.756	19,6	6,6
BRASIL	1.512.660	23.059.704	15,24	100,00

Fonte: adaptado de IBGE, 2016.

No Norte e Nordeste existem centenas de casas de farinha produtoras de seus derivados de valor comercial. Além de produzirem a maior quantidade de farinha do País, estas regiões também são responsáveis pelo maior consumo *per capita* do produto (CONAB, 2016).

**Figura 4 – Variação percentual da produção de *Manihot esculenta* – comparação set. 2016/2015**

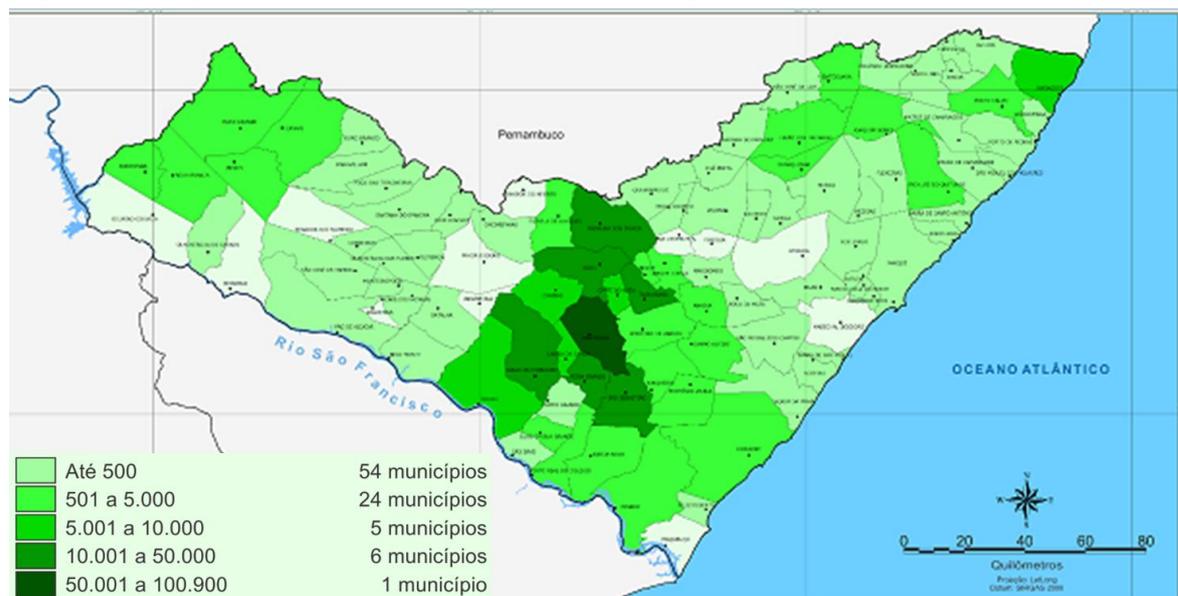
Fonte: IBGE, 2016.

*Manihot esculenta* é comercializada sob a forma de raiz e derivados, a partir dos quais podem ser obtidos até mais de 100 produtos, tais como: biscoitos, bolos, farinhas etc. Destaca-se também como excelente fonte de energia, além de ser uma atividade agrícola de baixo investimento e de fácil comercialização (CHISTÉ; COHEN 2011).

No estado de Alagoas, dentre as culturas produzidas, algumas causam grande preocupação, haja vista a grande quantidade de resíduos que são gerados a partir delas. Dentre estas, estão incluídas as culturas de algodão, amendoim, coco, feijão e mandioca. Estas, além de serem representativas em termos de produção, geram grande quantidade de biomassa residual (SOUZA, 2011).

O cultivo de mandioca tem crescido consideravelmente no estado de Alagoas, e já há uma década mantém sua posição de segunda maior safra agrícola do Estado, apresentando no ano de 2014 uma produção de 259.256 toneladas, só perdendo para cana-de-açúcar 22.422.500 toneladas. No ano de 2015, sua produção foi de 293.129 toneladas, já para a cana-de-açúcar 20.714.441 toneladas (IBGE, 2015). O que denota um crescimento de 13,07% na produção de mandioca para este ano. Enquanto que, para a cana-de-açúcar houve uma queda de 7,62% na produção. A mandioca é uma cultura estabelecida em quase todo o território alagoano e dela é possível aproveitar ainda suas folhas, cascas e caule. Os municípios de Arapiraca (com produção entre 50.001(t) a 100.900 (t)), Taquarana, Girau do Ponciano, Feira Grande, São Sebastião, Igaci e Palmeira dos Índios (com produção entre 10.001(t) a 50.000(t)) destacam-se como os maiores produtores desta cultura, como pode ser observado na figura 5 (IBGE 2015; SEPLANDE 2014).

**Figura 5 – Mapa da produção de mandioca (t) em Alagoas**



Fonte: Adaptado de SEPLANDE, 2014.

No estado de Alagoas, as raízes de mandioca têm como principal destino as agroindústrias de processamento de farinha, ou “casas de farinha” como são conhecidas. Em quinze municípios do agreste alagoano (Arapiraca, Campo Grande, Craíbas, Coité do Nóia, Feira Grande, Girau do Ponciano, Igaci, Junqueiro, Lagoa da Canoa, Limoeiro de Anadia, Olho D’Água Grande, Palmeira dos Índios, São Sebastião, Taquarana e Teotônio Vilela) tem-se mais de 600 casas de farinha (SANTIAGO, et al., 2005; SOUZA, 2011).

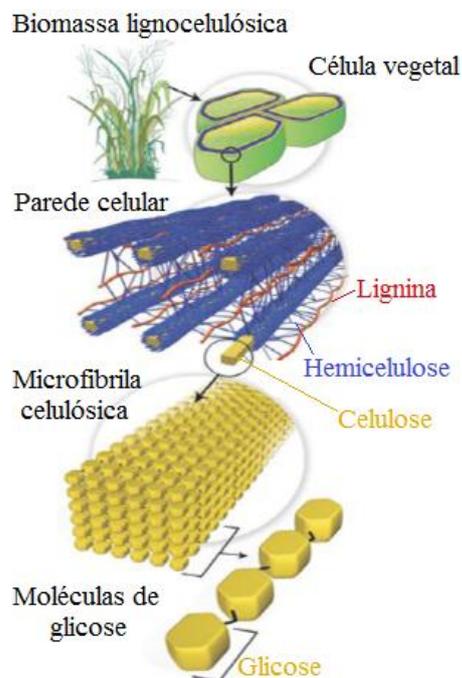
Na produção de energia, os resíduos da mandioca associado a outros elementos pode ser uma alternativa viável no quesito energia sustentável o que é tão importante no século em

que estamos vivendo (SILVA, 2015a). Além disso, pesquisas com biomassas alternativas podem ajudar a diminuir o custo da produção do etanol lignocelulósico e explorar a viabilidade em escala comercial (PATEL; PATEL, 2015).

### 3.5 Estruturas químicas e pré-tratamentos empregados na biomassa lignocelulósica visando à produção de etanol

Matérias-primas lignocelulósicas são formadas por estruturas duras e fibrosas (Figura 6), compostas em grande parte pelos polissacarídeos celulose, hemicelulose e lignina (Tabela 2). A lignina é formada por álcoois aromáticos, os quais se encontram unidos por ligações covalentes e de hidrogênio (NUNES et al., 2013). A celulose é um polímero linear do dímero glicose-glicose (celbiose), rígido e difícil de ser quebrado. Por sua vez, a hemicelulose, em geral, é constituída de uma cadeia principal de xilose (ligações  $\beta$ -1,4). E ainda, em menores proporções, encontram-se gorduras, proteínas e outros compostos, o que depende do vegetal de origem, da espécie, da região de cultivo, idade, período da colheita do material e entre outros fatores (KUMAR, 2016; NANDA et al., 2014).

**Figura 6 – Representação da estrutura da biomassa lignocelulósica indicando a disposição dos polissacarídeos celulose, hemicelulose e lignina**



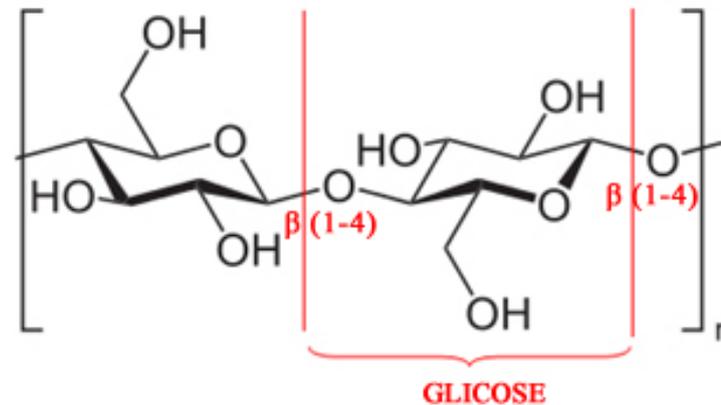
Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2012.

**Tabela 2 – Composição química da biomassa lignocelulósica.**

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

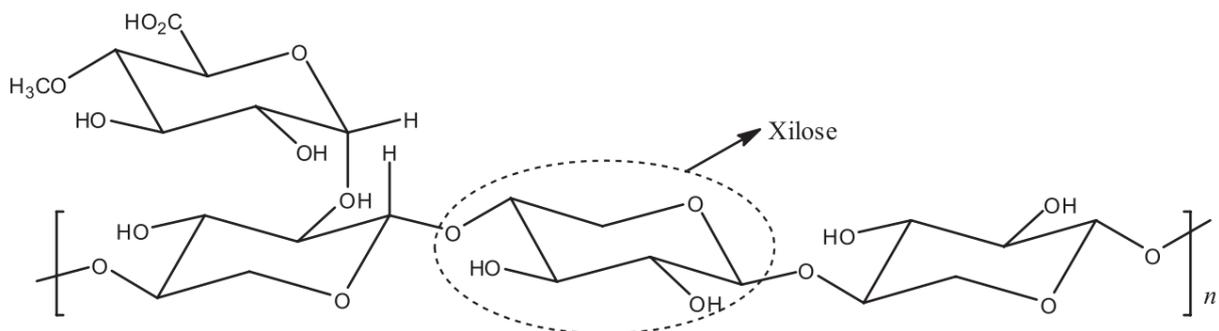
Fonte: Adaptado de VAN MARIS et al., 2006.

A celulose apresenta regiões ordenadas com unidades repetitivas de celobiose (Figura 7), e por essa razão, é considerado como um homopolissacarídeo (SANTOS et al., 2012). A estrutura apresenta-se sob a forma de uma cadeia linear homopolissacarídica formada entre 2000 a 15000 unidades de D-glicose ligadas por  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) – glucosídicas.

**Figura 7 – Estrutura da celulose com suas regiões ordenadas de celobiose**

Fonte: TÍMÁR-BALÁZSY; EASTOP, 1998.

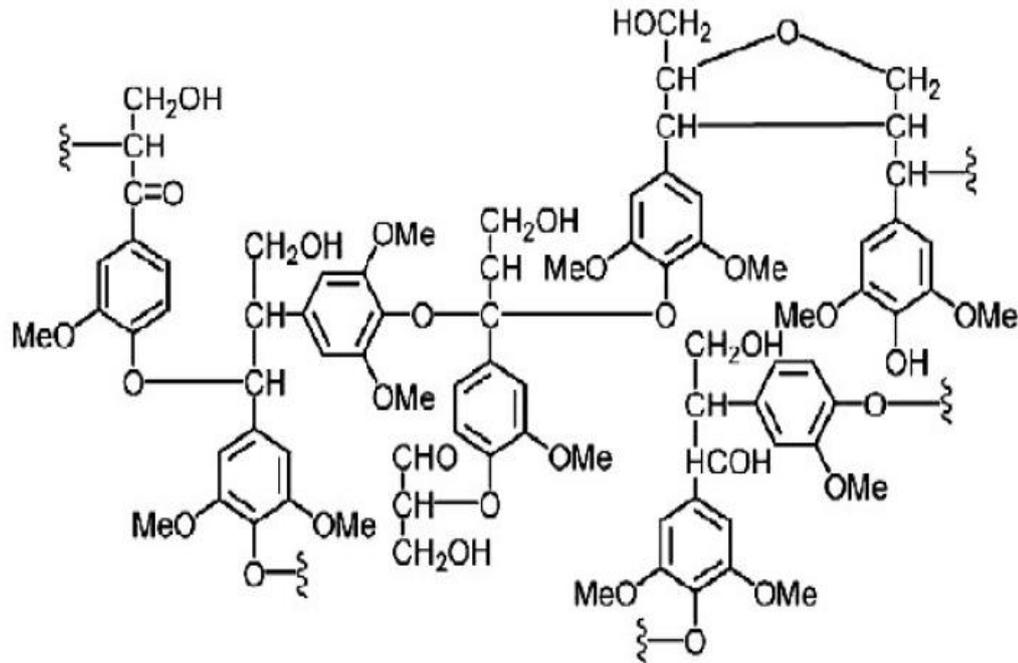
A hemicelulose é um polímero formado por monômeros de pentose (xilose, arabinose) e hexoses (manose, glicose, galactose) e ácidos urônico (ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico). As ligações presentes nesses açúcares são do tipo  $\beta$ -1,4-glicosídica ou  $\beta$ -1,3-glicosídica (Figura 8).

**Figura 8 – Representação esquemática da hemicelulose**

Fonte: SANTOS et al., 2012.

A lignina (Figura 9) compõe cerca de 20-30% da biomassa lignocelulósica e sua composição consiste de resíduos fenólicos (KUMAR et al., 2008). É um polímero que aumenta significativamente a resistência mecânica das plantas, dada a sua relação com as microfibrilas da celulose (FENGEL; WEGENER, 1989).

**Figura 9 – Estrutura geral da lignina apresentando seus resíduos fenólicos**



Fonte: CHANG, 2007.

Sabe-se que no processo de produção do etanol através de resíduos lignocelulósicos, existem três etapas principais que envolvem o pré-tratamento, a hidrólise e a fermentação do hidrolisado (LIMA, 2013). Cada uma com características particulares, temperaturas e pressões adequadas buscando obter o melhor resultado. Os pré-tratamentos podem-se ser: físicos, químicos, biológicos e combinados. Devido à recalcitrância da biomassa lignocelulósica, uma etapa de pré-tratamento se faz necessária a fim de promover a hidrólise dos carboidratos (LEE; LIM, 2013).

O pré-tratamento físico da matéria-prima, promove a “quebra” do material, com a finalidade de desestruturar a parede celular tornando-a mais acessível aos tratamentos posteriores: químico e biológico (ROSA; GARCIA, 2009). É muito comum empregar o pré-tratamento com ácido diluído que tem menor custo, tornando o processo menos oneroso (MOOD et al., 2013). Os vários processos de pré-tratamentos podem ser visualizados na tabela 3.

Tabela 3 – Descrição de pré-tratamentos existentes

	Processos	Descrição	Tempo de reação
FÍSICOS	Explosão de vapor	A biomassa triturada é tratada com vapor saturado (160° - 260 °C) seguido de uma rápida descompressão.	1 – 10 min
	Termo-hidrólise	Utiliza água quente a alta pressão (pressões acima do ponto de saturação) para hidrolisar a hemicelulose.	30 min
QUÍMICOS	Hidrólise ácida	Por meio do uso de ácidos: sulfúrico, clorídrico ou nítrico, concentrados ou diluídos.	2 – 10 min
	Organosolv	Uma mistura de um solvente orgânico (metanol, bioetanol e acetona por exemplo) com um catalizador ácido (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCl) é usada para quebrar as ligações internas da lignina e hemicelulose.	40 – 60 min
COMBINADOS	Afex (Ammonia fiber exposition)	Exposição à amônia líquida a alta temperatura e pressão, por um certo período de tempo, seguida de uma rápida descompressão.	
	Explosão de CO <sub>2</sub>	Similar explosão de vapor.	

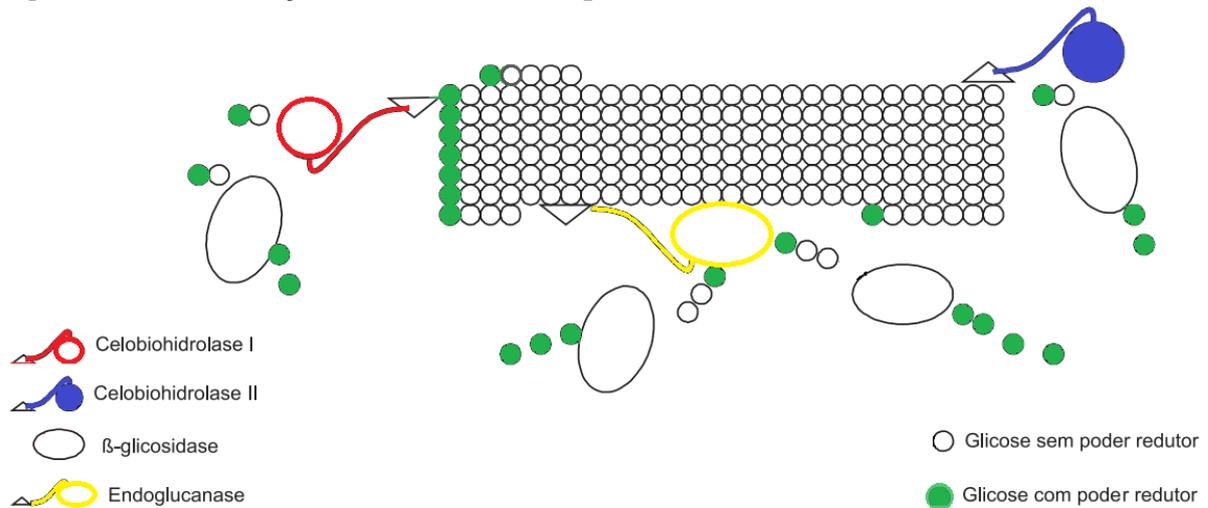
Fonte: Adaptado de ROSA; GARCIA, 2009.

### 3.6 Hidrólise enzimática

Também conhecida como sacarificação, é a etapa na qual ocorre a clivagem dos polissacarídeos contidos nos materiais lignocelulósicos em açúcares. No processo de produção de etanol de segunda geração, existem dois tipos de hidrólise que são mais comumente usadas: a) hidrólise com ácido, diluído ou concentrado; Com ácido concentrado existe a necessidade da utilização de equipamentos que resistam à corrosão o que representa uma desvantagem em razão do alto custo do produto final (SILVA, 2014); b) hidrólise enzimática. Ainda é considerada uma das etapas mais difíceis, e sua eficiência está intimamente relacionada com o desempenho obtido no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (PEREIRA et al., 2016).

Em razão da proteção da celulose pelos outros componentes da biomassa (hemicelulose e lignina), torna-se bastante difícil a quebra deste polímero (ROSA; GARCIA, 2009). No entanto, a tecnologia mais promissora para a conversão de biomassa lignocelulósica, visando à produção de etanol baseia-se na quebra enzimática da celulose usando enzimas celulolíticas (ASGHER; AHMAD; IQBAL, 2013; IQBAL et al. 2011; IQBAL; KYAZZE; KESHAVARZ, 2013). Segundo Pirota et al., (2015) as celulasas formam um complexo de enzimas que atua na conversão do polímero insolúvel de celulose em açúcares fermentescíveis (Figura 10). As enzimas possuem alta especificidade, não exigindo investimentos elevados em equipamentos, com custo moderado e não há formação de inibidores (RABELO et al., 2011).

**Figura 10 – Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico**

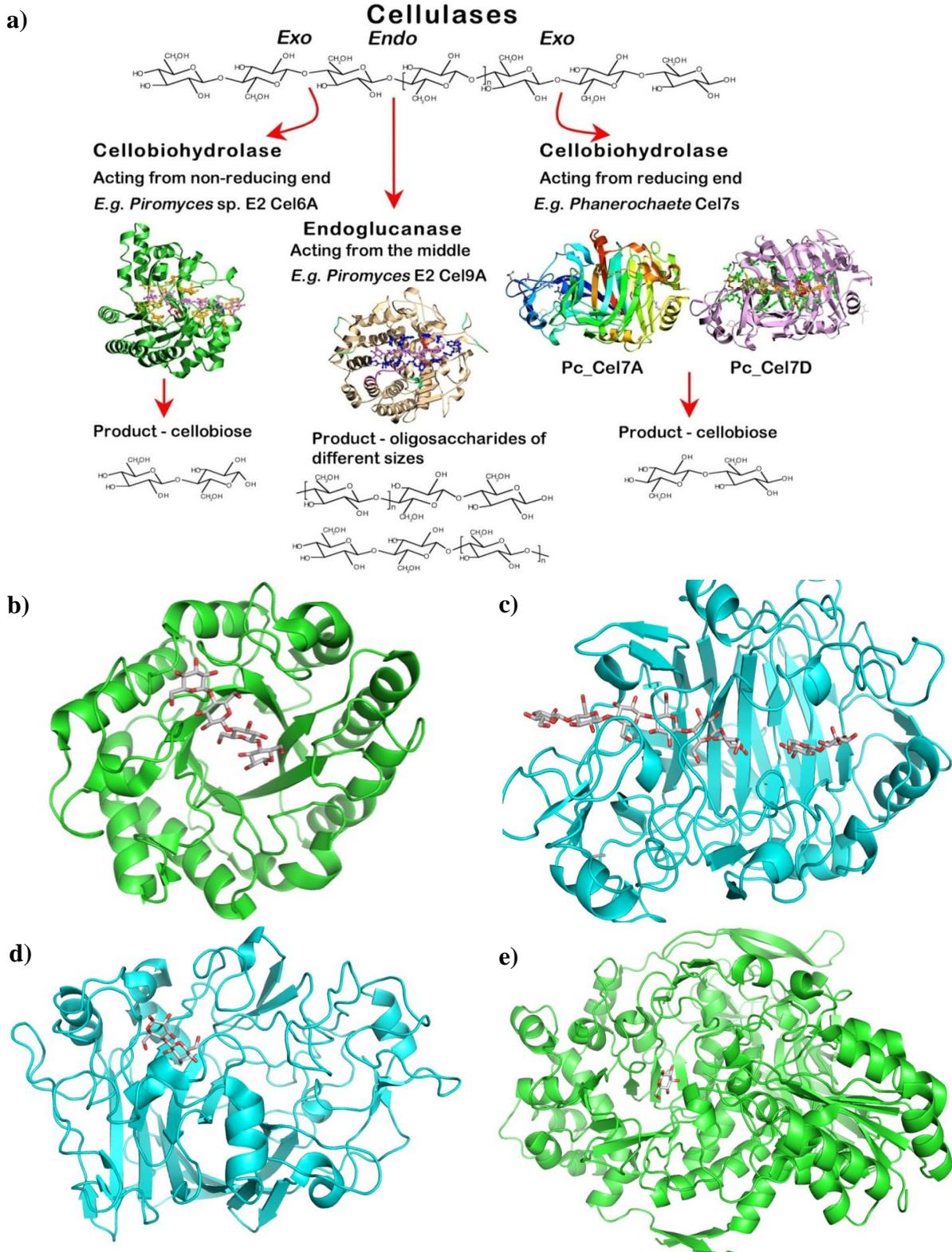


Fonte: Adaptado de CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010.

Para Shahzadi et al., (2014), a produção de etanol combustível a partir de biomassa lignocelulósica por meio da hidrólise da celulose é uma ferramenta promissora do mundo moderno. Portanto, em processos de bioconversão, essa rota tecnológica oferece vantagens sobre as demais. Vale ressaltar que, devido aos bons rendimentos glicosídicos, o processo enzimático de conversão de celulose em glicose por meio das celulases é o mais utilizado, mesmo com a possibilidade de contaminação em razão do longo tempo envolvido nesta etapa, o que torna a fração hidrolisada rica em açúcares, e as enzimas susceptíveis ao ataque de microrganismos contaminantes, tais como bactérias e fungos (CORTEZ, 2010).

As celulases são classificadas de acordo com a sua especificidade de atuação no substrato celulósico (Figura 11), e são divididas em três grupos: endoglucanases que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases ou celobiohidrolases que atuam na região externa (terminais redutores e não redutores) da celulose para a liberação da celobiose e as β-glicosidases ou celobioses que hidrolisam moléculas de celobiose em glicose a partir das extremidades redutoras (IJAZ et al., 2014; OGEDA; PETRI, 2010; WATANABE; TOKUDA, 2010). Devido à alta complexidade estrutural das hemiceluloses, várias enzimas são requeridas para sua completa degradação. Para tanto, são usadas as hemicelulases que atuam quebrando cadeias poliméricas da hemicelulose (FARINAS, 2011).

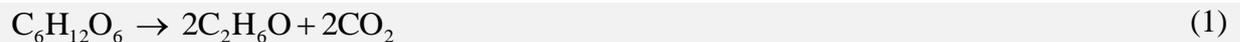
Figura 11 – Representação das enzimas do complexo celulolítico e estruturas tridimensionais: a) celulases; b) endoglucanase em complexo com cetotetraose (Cod. Pdb 5I79) c) exoglucanases em complexo com celohexose e celobiose (Cod. Pdb 7CEL); d)  $\beta$ -glicosidase em complexo com celobiose (Cod. Pdb 2RFY); e)  $\beta$ -glicosidase em complexo com glicose (Cod. Pdb 5K6M)



As hemicelulases são produzidas por fungos filamentosos, como exemplo, o *Aspergillus niger*. Dentre elas, algumas como  $\alpha$ -D-glucuronidase,  $\alpha$ -D-galactosidase e acetil-xilano-esterase atuam nas cadeias laterais. Após a liberação, das cadeias laterais, a cadeia principal composta por xilana pode ser clivada por xilanases e  $\beta$ -xilosidases. (RYABOVA et al., 2009). As hemicelulases mais conhecidas são as xilanases e as  $\beta$ -glicanases (KOBELITZ, 2008).

### 3.7 Fermentação etanólica

O etanol pode ser produzido por fermentação etanólica a partir de produtos agrícolas, materiais celulósicos ou resíduos de plantas (BAPTISTA et al., 2006; KUMAR, 2015; WU, 2014). A fermentação é a ação das leveduras sobre açúcares fermentescíveis. A reação global da fermentação (Equação 1) demonstra que com 1 mol de glicose (180 g) é possível gerar 2 moles de etanol (92 g) e 2 moles de dióxido de carbono (88 g). Desta forma, o rendimento teórico para a produção de etanol é de 0,511 g/g. Este valor não é observado na prática em função da utilização de parte da glicose para produção de gliceróis e ácidos orgânicos, substâncias necessárias para a síntese de material celular e manutenção da levedura (FAN, et al., 2013; OURA, 1974).



Geralmente as leveduras são os microrganismos mais usados neste processo. *Saccharomyces cerevisiae* tem dominado há anos a fermentação alcoólica, e ainda tem sido considerada como a melhor escolha para a fermentação de etanol em escala industrial (LE, 2013), alcançando bons desempenhos em conversão de glicose a etanol, produtividade e tolerância alcoólica e aos inibidores do pré-tratamento e da fermentação. No entanto, só fermenta hexoses, não sendo capaz de fermentar pentoses, sendo este último os maiores constituintes da fração de hemicelulose (CARRASCO, et al., 2013; OLOFSSON, 2008; SILVA, 2014).

Algumas leveduras naturalmente ocorrentes, como a *Pichia segobiensis*, *Candida shehatae*, entre outras, têm a capacidade de fermentar xilose a etanol, apresentando taxas de produção mais reduzidas quando comparadas as da fermentação de glicose (AGBOGBO, 2008; CGEE, 2010; KUHAD et al., 2011; PRIOR, 1990). Vale ressaltar que para viabilizar a

produção de etanol de segunda geração em escala comercial, faz-se necessária a integração desses dois processos, obtendo-se desta forma um maior rendimento.

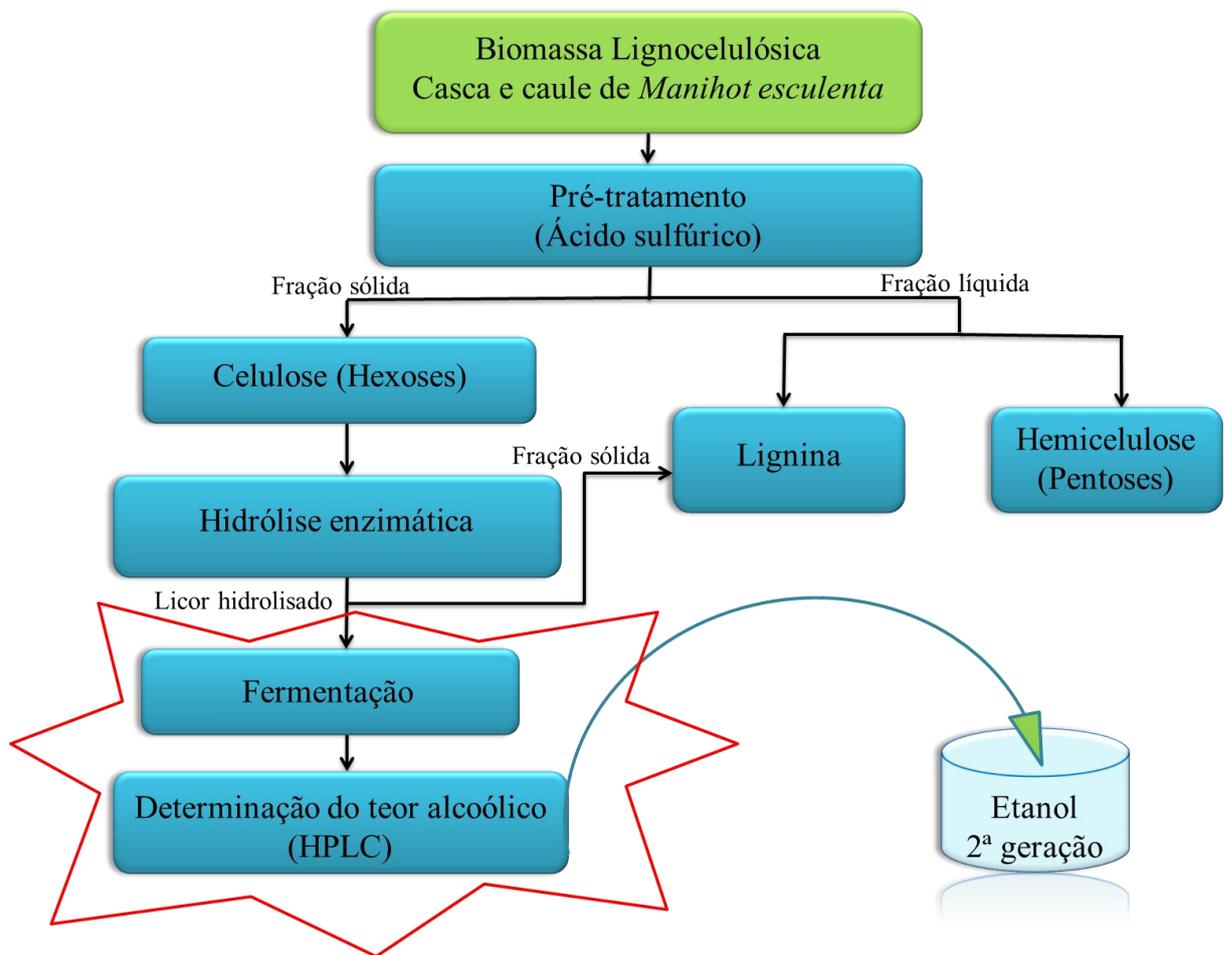
Com o objetivo de integrar os referidos processos, pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando basicamente duas abordagens. 1<sup>a</sup>) busca a construção de um microrganismo recombinante, com adicional habilidade de processar a via das pentose-fosfato. 2<sup>a</sup>) visa aumentar os rendimentos em etanol através da engenharia genética em microrganismos que já possuem a habilidade de fermentar tanto hexoses quanto pentoses (CGEE, 2010; SARKAR et al., 2012; VAN VLEET, 2009).

#### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos (LTBA) localizado no Centro de Tecnologia – CTEC da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Campus A. C. Simões, durante o ano de 2016.

As etapas experimentais realizadas para o desenvolvimento deste estudo estão ilustradas no fluxograma da figura 12.

**Figura 12 – Fluxograma das etapas envolvidas no estudo da hidrólise enzimática e fermentabilidade em resíduos lignocelulósicos de *Manihot esculenta***



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

#### 4.1 Matéria prima

Os resíduos de *Manihot esculenta*, utilizados neste estudo, foram oriundos das sobras de indústrias de municípios alagoanos. Os demais reagentes de laboratório utilizados foram adquiridos em grau analítico.

#### 4.2 Higienização, secagem e trituração dos resíduos de *Manihot esculenta*

Na etapa de higienização os resíduos de *Manihot esculenta* foram deixados de molho em solução de 100 ppm de hipoclorito de sódio durante 15 min. Após essa etapa, os resíduos foram lavados em água corrente e posteriormente submetidos a secagem em estufa a 50 °C.

Após o material se apresentar desidratado (seco), foi triturado em liquidificador industrial obtendo-se a farinha para seguir as etapas de caracterização química, pré-tratamento ácido, hidrólise enzimática e fermentação.

#### 4.3 Caracterização química dos resíduos desidratados de *Manihot esculenta*

Análises da composição química dos resíduos da *Manihot esculenta* foram realizadas antes do pré-tratamento. Foram determinados o teor de umidade, proteínas, extrativos, lignina insolúvel, lignina solúvel, carboidratos e cinzas. Para umidade e proteínas, seguiram-se as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005) e AOAC (2002).

##### 4.3.1 Determinação de umidade

O teor de umidade foi baseado na determinação da perda de peso dos resíduos de *Manihot esculenta* submetido ao aquecimento a 105 °C, até peso constante. Determinado pela diferença do percentual entre a massa de amostra inicial e a massa de amostra após o processo de secagem. As análises foram conduzidas em triplicata.

##### 4.3.2 Determinação de proteínas

Digestão da matéria orgânica: 0,5g de amostra foram transferidos para um tubo de Kjeldahl e adicionados 2g 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 de exaustão de gases, adicionou-se ao tubo cerca de 10mL de ácido sulfúrico concentrado. O tubo foi acoplado ao digestor de Kjeldahl, a cada 15 min, a temperatura foi elevada suavemente (mais 50°C) até que a mesma chegasse a 350°C. O tempo de digestão variou de 1

a 4 horas. A amostra está digerida quando apresentar 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.

Destilação do nitrogênio: Transferiu-se 25mL de ácido bórico a 4% para um Erlenmeyer de 250mL 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. Adicionou-se ao tubo, contendo a amostra digerida, água destilada até um pouco menos da metade do tubo e 3 a 5 gotas de fenolftaleína 1%. O tubo foi acoplado ao destilador de Buchi. Após a solução estar aquecida, 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 100mL.

Titulação do nitrogênio: A solução do Erlenmeyer foi titulada com ácido clorídrico 0,1N padronizado até o aparecimento da coloração avermelhada. O teor de proteína foi determinado pela equação 2.

$$\text{Proteína Total (g/100 g)} = \frac{V_{\text{HCl}} \cdot f_{\text{HCl}} \cdot N_{\text{HCl}} \cdot F \cdot 1,4}{P} \quad (2)$$

Em que:

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.

#### 4.3.3 Determinação de extrativos

Nos resíduos de *Manihot esculenta* desidratados determinou-se o teor de extrativos, essa determinação foi baseada na norma NREL nº 10 *Determination of Extractives in Biomass* (2005). Foram pesadas 7,0 g (massa seca) dos resíduos desidratados e adicionadas a cartuchos de celulose previamente secos em estufa a 100 °C, em seguida colocou-se em um sistema de extração Soxhlet, utilizando-se 500 mL de etanol 95% (v/v) como solvente. Após adicionar o solvente ao balão extrator de fundo redondo e ajustar o balão na manta aquecedora, a extração

pelo solvente foi realizada por um período de 12 horas. Após esse período foi possível observar a transparência do solvente ao redor do cartucho (característica da total extração). Após essa etapa, os cartuchos foram colocados em placas de Petri, previamente taradas, levadas a estufa a 105 °C e após estarem totalmente secos, foram pesados para determinação do teor de extrativos utilizando a equação 3:

$$\% \text{ Extrativos} = \left( \frac{M_b - M_f}{M_b} \right) * 100 \quad (3)$$

Em que:

$M_b$  → massa de resíduo seco (g);

$M_f$  → massa de resíduo livre de extrativos (g).

Para determinação de lignina insolúvel, lignina solúvel, carboidratos e cinzas, o estudo foi baseado no procedimento descrito por GOUVEIA et al., (2009).

#### *Hidrólise com ácido sulfúrico 72%*

Amostras de 2g (casca e caule secos e triturados) de *Manihot esculenta* foram pesadas e transferidas para béqueres de 100 mL e tratados com 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% v/v, sob agitação a 45 °C por 7 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 do reator, 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 utilizada para determinação de lignina solúvel.

#### 4.3.4 Determinação de lignina insolúvel na fração sólida

Lignina insolúvel foi determinada de acordo com o método Klasson modificado por ROCHA et al., (1997). O material retido no papel de filtro 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 conforme a Equação 4 (ROCHA et al.,1997).

$$\% L_{Ki} = \frac{M_K - M_C}{M_A} * 100 \quad (4)$$

Em que:

- $L_{Ki}$  → lignina Klason insolúvel;  
 $M_k$  → massa de lignina insolúvel seca;  
 $M_C$  → massa de cinzas;  
 $M_A$  → massa da amostra seca.

#### 4.3.5 Determinação de lignina solúvel

A quantidade de lignina solúvel foi determinada conforme o método Klason avaliado por GOUVEIA et al., (2009) pela medida de absorvância a 280 nm em espectrofotômetro. O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a Equação 5.

$$C_{lig} = 4,187 * 10^{-2} (A_T - A_{pd}) - 3,279 * 10^{-4} \quad (5)$$

Em que:

- $C_{lig}$  → concentração de lignina solúvel, em g/L;  
 $A_T$  → absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm;  
 $A_{pd}$  →  $c_1 \varepsilon_1 + c_2 \varepsilon_2$  – absorvância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos carboidratos (furfural e HMF), cujas concentrações  $c_1$  e  $c_2$  foram determinadas previamente por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e  $\varepsilon_1$  e  $\varepsilon_2$  são as absorvidades e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L g<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

#### 4.3.6 Determinação de carboidratos

A determinação de carboidratos 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 mol/ L; vazão de 0,6 mL/min; 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 realizada, baseando-se 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/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 276 nm, em cromatógrafo Shimadzu.

#### 4.3.7 Determinação de cinzas

Após a determinação da lignina insolúvel em meio ácido, a mesma, juntamente com o papel de filtro, foi transferida para um cadinho de porcelana, previamente tarado. A amostra foi calcinada lentamente até 300 °C e mais 2 h a 800 °C, em uma mufla. Na determinação das cinzas totais, foram pesados aproximadamente 2 g da biomassa em cadinho de porcelana previamente tarado. Por diferença de massa, o teor de cinzas da lignina insolúvel e das cinzas totais foi determinado conforme a Equação 6.

$$\% \text{ cinzas} = \frac{M_c}{M_a} * 100 \quad (6)$$

Em que:

% cinzas → percentual em massa de cinzas;

M<sub>c</sub> → massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio);

M<sub>a</sub> → massa da amostra base seca.

#### 4.4 Pré-tratamento com ácido sulfúrico

O pré-tratamento com ácido sulfúrico foi realizado seguindo metodologia utilizada por Silva (2015b), que estudando o pré-tratamento da casca da *Manihot esculenta* em três níveis (conc. ácido; conc. massa e tempo), realizou um planejamento experimental com três fatores em triplicata e o ponto central, visando a otimização do processo (Tabela 4). A partir do

referido planejamento, foi possível observar qual a melhor resposta dentre os 11 ensaios realizados (todos mantidos a temperatura de 120°C).

**Tabela 4 – Fatores e níveis estudados no planejamento experimental para a *Manihot esculenta***

Fatores	Nível inferior (-)	Ponto central (0)	Nível superior (+)
1. Conc. de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	0,5	1,5	2,5
2. Massa (g)	1	3	5
3. Tempo (min)	30	45	60

Fonte: SILVA, 2015b.

Em Silva (2015b), um planejamento fatorial foi desenvolvido com o objetivo de verificar a influência da concentração de ácido, concentração de massa e tempo de pré-tratamento sobre da casca da *Manihot esculenta*. Os valores dos níveis das variáveis estudadas podem ser verificados na tabela 5.

**Tabela 5 – Valores codificados e valores “reais” para cada fator estudado da análise do pré-tratamento ácido**

Ensaio	Planejamento fatorial em Valores codificado			Planejamento fatorial em Valores reais		
	Conc. de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	Massa (g)	Tempo (min)	Conc. de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	Massa (g)	Tempo (min)
1	-1	-1	-1	0,5	1	30
2	-1	+1	-1	0,5	5	30
3	+1	-1	-1	2,5	1	30
4	+1	+1	-1	2,5	5	30
5	-1	-1	+1	0,5	1	60
6	-1	+1	+1	0,5	5	60
7	+1	-1	+1	2,5	1	60
8	+1	+1	+1	2,5	5	60
9	0	0	0	1,5	3	45
10	0	0	0	1,5	3	45
11	0	0	0	1,5	3	45

Em que: (-1) valor codificado = menor valor; (+1) valor codificado = maior valor; (0) valor codificado = ponto central.

Fonte: SILVA, 2015b.

Os resultados obtidos em tal planejamento foram analisados estatisticamente por meio da análise da metodologia de superfície de resposta. Em seguida, foram determinadas as melhores condições de liberação de ART nos intervalos das condições experimentais utilizadas, uma vez que, um dos propósitos deste estudo é determinar a percentagem real de açúcares presentes nos polímeros de celulose e hemicelulose da biomassa pré-tratada (casca, caule e folha), a mesma metodologia utilizada para casca foi aplicada nas demais partes da planta.

#### 4.5 Atividade enzimática

O complexo enzimático foi caracterizado conforme a metodologia proposta por Ghose (1987) que determina a atividade celulósica total das enzimas, visando assim verificar a quantidade utilizada nas hidrólises.

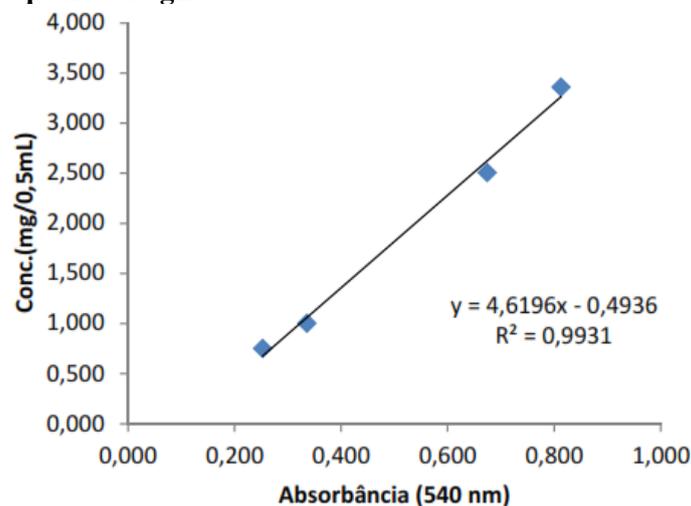
Em tubos de ensaio Folin Wu foi adicionado 1 mL de tampão citrato 50mM pH 4,8. Em seguida foram adicionados 0,5mL de enzima previamente diluída em tampão citrato e tiras de papel filtro Whatman nº 1 (1,0 x 6,0 cm) como substrato. Os tubos foram incubados em banho termostatizado a 50 °C por 60 minutos.

Após o período de incubação, adicionou-se 3 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a cada tubo e agitou-se para cessar a reação enzimática. Em seguida os tubos foram colocados em água fervente no banho-maria por 5 minutos, sendo posteriormente resfriados até atingir a temperatura ambiente. Adicionou-se 20 mL de água destilada e agitou-se, dando sequência a leitura em espectrofotômetro a 540nm.

Para o preparo da solução de DNS usada nos ensaios de atividade enzimática foi pesado 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e dissolvido à temperatura ambiente em 20 mL de hidróxido de sódio 2 mol/L e 50 mL de água destilada. Após completar a dissolução do DNS, adicionou-se 30 g de tartarato duplo de sódio e potássio (sal de Rochelle). Para facilitar a dissolução, a solução foi aquecida até no máximo 40 °C. Após a adição do sal de Rochelle, completou-se o volume para 100 mL com água destilada. A solução foi armazenada em frasco escuro e mantida sob refrigeração.

A curva de glicose foi obtida com valores de concentração de glicose versus a absorbância, como mostra a figura 13.

**Figura 13 – Curva padrão de glicose**



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Usando a curva de glicose, foi possível determinar a concentração liberada em cada reação enzimática. E a concentração de enzima foi estimada para exatamente 2,0 mg de glicose liberada durante a reação enzimática, definida como Filter Paper Unity (FPU). Com a quantidade de glicose liberada na medida FPU a uma diluição crítica de 2 mg, tem-se:

$$\begin{aligned} 2 \text{ mg glicose} &= 2 / (0,18 \times 0,5 \times 60 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}) \\ &= 0,37 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \end{aligned}$$

Sendo assim, a quantidade de enzima que libera 2 mg de glicose na reação, é definida pela equação 7.

$$FPU = \frac{0,37}{\text{concentração de enzima que realiza 2,0 mg de glicose}} \text{ unidade mL}^{-1} \quad (7)$$

#### 4.6 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada sobre as biomassas (casca e caule) pré-tratadas de *Manihot esculenta*. Nesta etapa, foi utilizado o complexo de celulases comercial CelliC® Ctec2 gentilmente cedida da Novozyme Latin America Ltda. Foram utilizados 20 FPU/g de biomassa pré-tratada e 15% de sólidos, e volumado para 50 mL de tampão citrato, pH 4,8 (50 mM) em erlenmeyer de 250 mL sob agitação à 50 °C e 150 rpm, por 72 horas em shaker. Durante a reação foram coletadas alíquotas em diferentes tempos para posteriormente quantificar os açúcares liberados.

#### 4.7 Fermentação etanólica

Para a fermentação etanólica, 20 mL do licor hidrolisado foi suplementado com os seguintes nutrientes: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1,4 g/L); Uréia (5,32 g/L); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5,6 g/L); Extrato de levedura (6,8 g/L). O microrganismo utilizado foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (JAY-270), cultivada em meio líquido YPD contendo 20 g/L de glicose, 10 g/L de levedura e 20 g/L de peptona. Para o preparo da suspensão, após atingir a fase exponencial de crescimento, as leveduras foram centrifugadas a 9000 rpm por 10 minutos, eliminando o meio sobrenadante. A fermentação ocorreu conforme descrito por Wolf (2011). Após 24 horas em incubadora a 30 °C e 150 rpm a fermentação foi encerrada, sendo a concentração de carboidratos e teor alcoólico, determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas etapas subsequentes são abordados todos os resultados obtidos neste estudo, bem como as análises discursivas referentes a cada um deles. Os resultados representam a média de três ensaios realizados sob as mesmas condições.

### 5.1 Composição química dos resíduos de *Manihot esculenta*

A composição química dos resíduos não comestíveis de *Manihot esculenta* para este estudo foi indicada como celulose, hemicelulose, lignina, proteínas, extrativos e cinzas (Tabela 6).

**Tabela 6 – Composição química dos resíduos de *Manihot esculenta* desidratados**

Componentes	Casca (%)	Caule (%)	Folha (%)
Celulose	36,12±0,03	21,52±0,010	8,59±0,205
Hemicelulose	4,17±0,004	8,77±0,004	2,91±0,069
Lignina Insolúvel	16,34±0,675	28,00±0,782	42,72±0,680
Lignina Solúvel	2,43±0,333	1,89±0,286	4,96±0,186
Lignina Total	18,77±0,890	29,89±1,003	47,68±0,847
Proteínas	7,66±0,12	4,79±0,02	25,07±0,19
Extrativos	15,89±0,003	14,54±0,005	20,43±0,003
Umidade	9,46±0,001	8,54±0,004	8,12±0,002
Cinzas	3,23±0,006	4,86±0,004	3,51±0,001

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Os valores obtidos de celulose, hemicelulose, lignina, proteínas e extrativos para os resíduos de *Manihot esculenta* foram consideravelmente diferentes, quando comparados entre si. Segundo Vallejos et al., (2015) a composição química de um vegetal pode ser dessemelhante às várias partes analisadas do mesmo material. Para Queiroz et al., (2000) e Nuwamanya et al., (2012) a composição química dos vegetais pode sofrer influência sob diversos fatores, assim como, sua origem, condições de cultivo e ambientais, relação folha/colmo além das características intrínsecas da parede celular vegetal.

Conforme se observa na tabela 6, a composição média do polissacarídeo celulose ao longo das fibras do vegetal tem diminuição em torno de 60% da casca/raiz em relação ao caule, e de 40% do caule para a folha. Como pode ser observado, as cascas e caule do vegetal são mais ricos em celulose do que a folha. O teor de celulose encontrado nas cascas de *Manihot esculenta* deste estudo foi superior ao de Lounglawan et al., (2011) que reportou

11,58%. O teor de hemicelulose descrito pelos autores (52,24%) também foi diferente para as cascas, uma vez que neste estudo foi de 4,17%.

Observa-se também que a fração lignina encontrada nas folhas do vegetal é em torno de 2,5 vezes maior daquela quantificada nas cascas/raiz. Já para o caule, essa diferença de lignina é em torno de 1,6 vezes. O valor de lignina reportado neste estudo para o caule de *Manihot esculenta* está de acordo com Han et al., (2011) que encontraram valor de 24,3% e com Chen et al., (2007) cujo resultado foi de 26,10%. Os níveis elevados de lignina nas folhas podem estar associados à imprescindibilidade desse órgão em obter resistência mecânica e integridade vascular de sua parede celular, cuja função é conferida pela lignina (BI et al., 2011; DIXON et al., 2002; NGUYEN et al., 2016; VANHOLME et al., 2010).

Considerando ainda os valores de lignina reportados nesse estudo, faz-se necessário a implementação da etapa de deslignificação, assim como indicam vários estudos visando à produção de etanol de segunda geração (KARP et al., 2013; MINMUNIN; LIMPITIPANICH; PROMWUNGKWA, 2015; PRATTO et al., 2016; SINGH et al., 2014;). Uma vez que a lignina é responsável por dificultar o acesso ao polímero celulose, onde estão contidos os carboidratos fermentescíveis, assim como glicose e xilose, este último em menores proporções. De acordo com Mielenz (2001) e Keating et al., (2006), as principais vias de interferência da lignina são a digestão química, enzimática e microbiana. Como pode ser visto, altos graus de lignificação da matéria prima compromete o rendimento dos açúcares fermentescíveis, quando utilizados resíduos lignocelulósicos ricos em lignina na etapa de hidrólise.

Foi observado elevado percentual de proteínas nas folhas da *Manihot esculenta* (25,07%), para as cascas o percentual foi de 7,66%, e o caule apresentou menor valor (4,79%). Níveis elevados de proteínas nas folhas de *Manihot esculenta* também foram reportados por Chiwona-Karlun e Kawuki (2012), em um estudo de produção de bioetanol a partir da mandioca em que obtiveram 12,3% de proteínas.

A amostra da casca/raiz teve o maior teor de umidade, 9,46%; havendo uma pequena diferença em relação às outras amostras, as quais foram 8,54% e 8,12% para caule e folha, respectivamente. Dentre os elementos minerais quantificados, o caule apresentou maior teor de cinzas 4,86%, frente aos demais resíduos (Tabela 6). Nanssou et al., (2016) relataram um aumento no teor de cinzas para o caule e as cascas, 7,3% e 11,38%, respectivamente.

A literatura também menciona que os teores de carboidratos, presentes em resíduos lignocelulósicos, podem variar de acordo com a estação do ano. Desta forma, Adler et al.,

(2006) constatam que maiores quantidades de polissacarídeos podem ser alcançados se a colheita for realizada durante o inverno.

## 5.2 Pré-tratamento com ácido sulfúrico

O pré-tratamento ácido usado neste estudo foi o mesmo adotado por Silva (2015b) onde o melhor resultado obtido quanto a desassimilação de carboidratos foi reportado no ensaio 4 da tabela 5 (conc. ácido = 2,5%; conc. massa = 5 g e tempo = 30 min).

De acordo com Silva (2015b), as concentrações de açúcares totais reportados no pré-tratamento ácido variaram de 36,47 g/L a 93,23 g/L. Sendo este último a melhor resposta do pré-tratamento ácido encontrado no ensaio 4, como pode ser observado na tabela 7.

**Tabela 7 – Matriz de planejamento: Resultados do pré-tratamento ácido da casca da *Manihot esculenta* em resposta aos açúcares presentes na fração líquida**

Ensaio	Fator 1	Fator 2	Fator 3	ART (g/L)
1	-	-	-	39,35±1,30
2	-	+	-	92,11±0,19
3	+	-	-	36,47±1,74
4	+	+	-	93,23±3,16
5	-	-	+	37,12±4,10
6	-	+	+	88,49±2,79
7	+	-	+	36,66±3,47
8	+	+	+	81,88±1,61
9	0	0	0	75,59±0,39
10	0	0	0	85,22±0,50
11	0	0	0	82,73±0,44

Em que: Fator 1 = concentração de ácido (%); Fator 2 = concentração de biomassa (g); Fator 3 = tempo (min); (-) valor codificado = menor valor; (+) valor codificado = maior valor; (0) valor codificado = ponto central.

Fonte: Silva, 2015b.

## 5.3 Hidrólise enzimática

Os perfis cinéticos da biotransformação dos resíduos de *Manihot esculenta* em carboidratos fermentescíveis, quantificados em cromatógrafo, apresentaram valores bem próximos (Tabela 8).

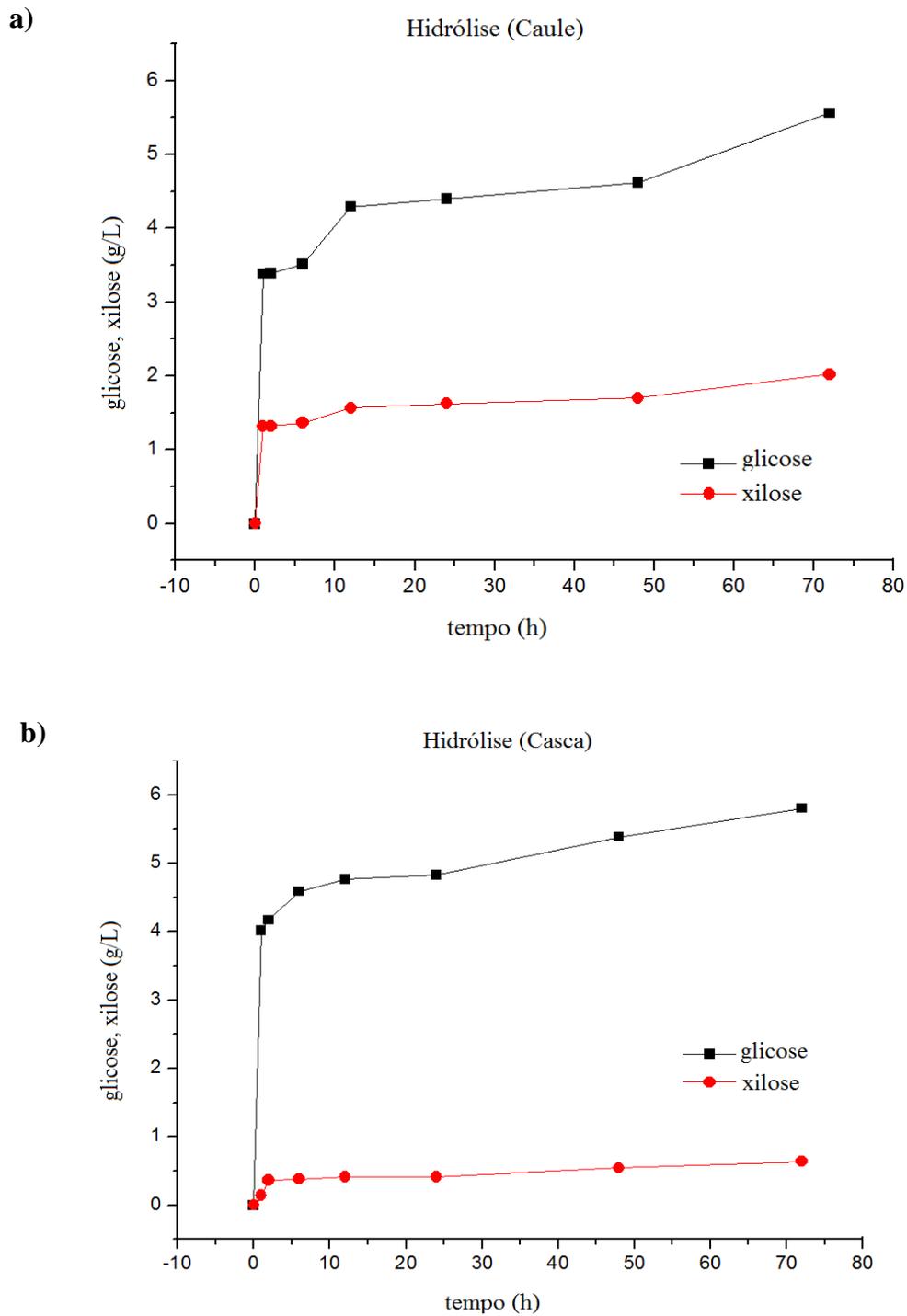
**Tabela 8 – Valores reais dos monossacarídeos, glicose e xilose, a partir dos resíduos (casca e caule) de *Manihot esculenta* durante hidrólise enzimática**

		Tempo (h)							
		0	1	2	6	12	24	48	72
Casca	Glicose (g/L)	0	4,01412	4,17518	4,58532	4,76568	4,82886	5,38692	5,80242
	Xilose (g/L)	0	0,14428	0,36312	0,38218	0,41496	0,41607	0,54426	0,64014
Caule	Glicose (g/L)	0	3,38312	3,38730	3,51201	4,29018	4,40076	4,62306	5,55894
	Xilose (g/L)	0	1,32060	1,32117	1,36702	1,56780	1,62333	1,69956	2,01996

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Como pode ser observado na tabela 8 e figura 14a e b, os resultados não demonstraram diferenças significativas na conversibilidade tanto das cascas/raiz como do caule em glicose e xilose, as condições de hidrólise foram as mesmas para os dois substratos em que se utilizou o complexo enzimático comercial Cellic Ctec2.

Figura 14 – Perfil da biotransformação do caule (a) e casca (b) de *Manihot esculenta* em açúcares fermentescíveis quantificados em HPCL



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Nota-se na figura 14a, que a taxa de desassimilação do carboidrato xilose a partir do caule foi mais rápida que na casca/raiz (Figura 14b). Esse comportamento pode estar associado à capacidade de o complexo enzimático atuar também sobre a hemicelulose, causando sua digestibilidade e liberação de xilose no licor sacarificado.

Ademais, os baixos níveis de xilose reportados em ambas as frações lignocelulósicas, 0,64 e 2,01 g/L para casca e caule, respectivamente, levantam a hipótese de que esses materiais possuem baixa quantidade de hemicelulose, tornando a hidrólise desses resíduos com complexos enzimáticos a base de hemicelulases economicamente inviáveis ao processo, visto que não teria ganhos significativos na concentração de pentoses a partir da hemicelulose.

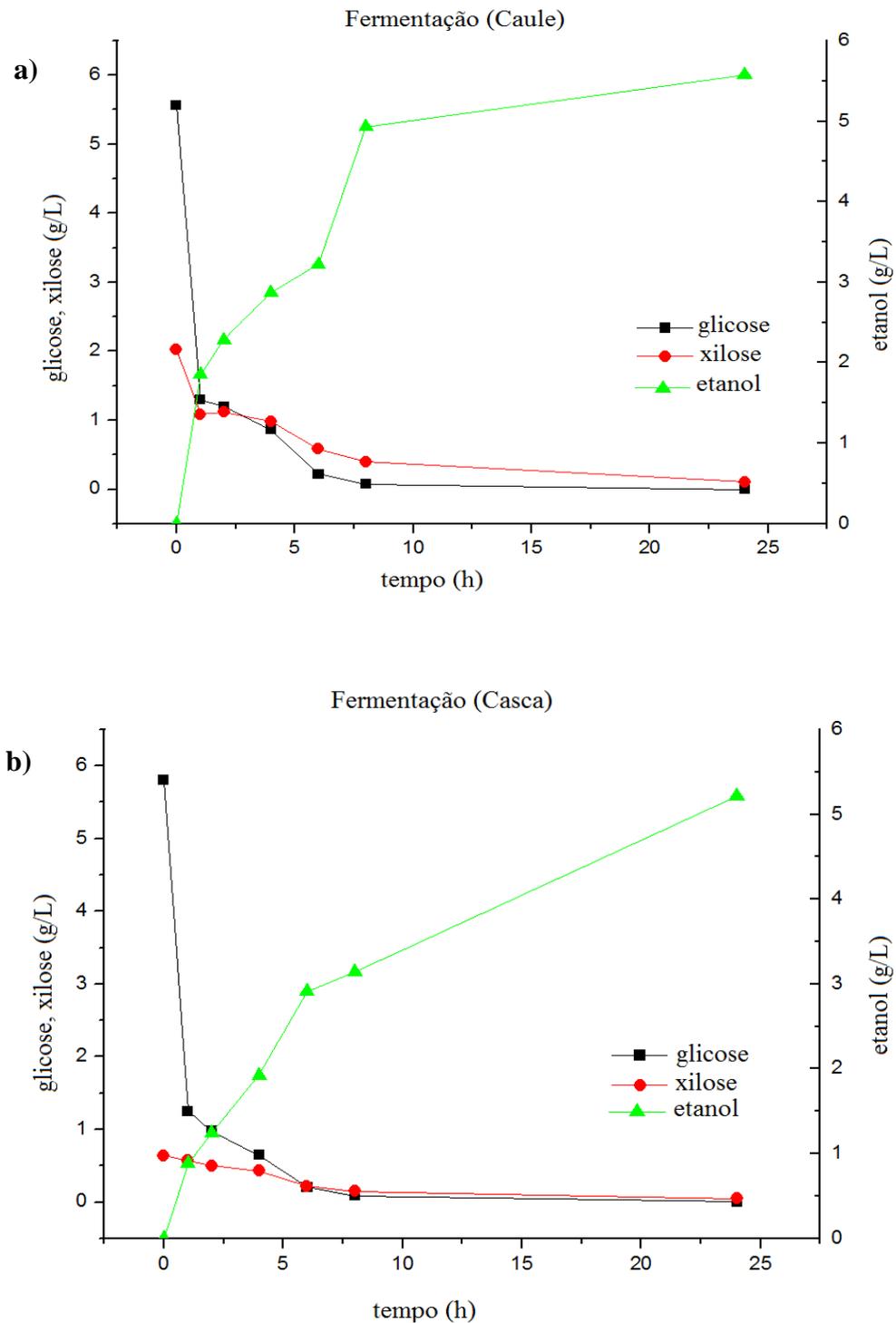
Assim como pode ser observado na figura 14a e b, considerando as cargas de carboidratos similares, os resíduos da casca e caule podem ser utilizados combinados em um único reator e meio reacional, visando a economia de tempo e energia. Entretanto, deve-se observar a carga de sólidos para suplementação do complexo enzimático que irá degradar o substrato, a partir da sua atividade enzimática. Ou seja, o volume da enzima necessário para converter 1 g de celulose em glicose.

#### **5.4 Fermentação**

Através dos resultados de hidrólise enzimática, percebe-se que a produção de etanol 2G a partir dos resíduos utilizados neste estudo, está intimamente relacionada com a conversão da glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, assim como relataram Kuloyo e colaboradores (2014) em estudo de hidrólise e fermentação da palma forrageira.

O licor sacarificado da hidrólise enzimática, contendo os açúcares fermentescíveis foi utilizado como substrato na fermentação. A conversão dos carboidratos em etanol, pela *Saccharomyces cerevisiae*, iniciaram nas primeiras horas (Figura 15), confirmando a disponibilidade desses açúcares ao microrganismo.

**Figura 15 – Fermentabilidade das frações líquidas do hidrolisado do caule (a) e casca (b), rico em açúcares fermentescíveis ilustrados pelo rendimento etanólico g/L**



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Conforme mostra na tabela 9, a produção máxima de etanol foi de 5,21 g/L para casca/raiz e de 5,57 g/L para o caule.

**Tabela 9 – Cinética do consumo dos carboidratos e produção de etanol a partir das frações líquidas do hidrolisado do caule e casca de *Manihot esculenta***

		Tempo (h)						
		0	1	2	4	6	8	24
Casca	Glicose (g/L)	5,8024	1,2497	0,9769	0,6477	0,2062	0,0875	0,0055
	Xilose (g/L)	0,6401	0,5716	0,4983	0,4314	0,2237	0,1502	0,0473
	Etanol (g/L)	0	0,8830	1,2467	1,9276	2,9106	3,1429	5,2163
Caule	Glicose (g/L)	5,5589	1,2955	1,1975	0,8636	0,2178	0,0751	0
	Xilose (g/L)	2,0199	1,0877	1,1151	0,9811	0,5860	0,3979	0,1056
	Etanol (g/L)	0	1,8561	2,2887	2,8689	3,2229	4,9325	5,5755

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

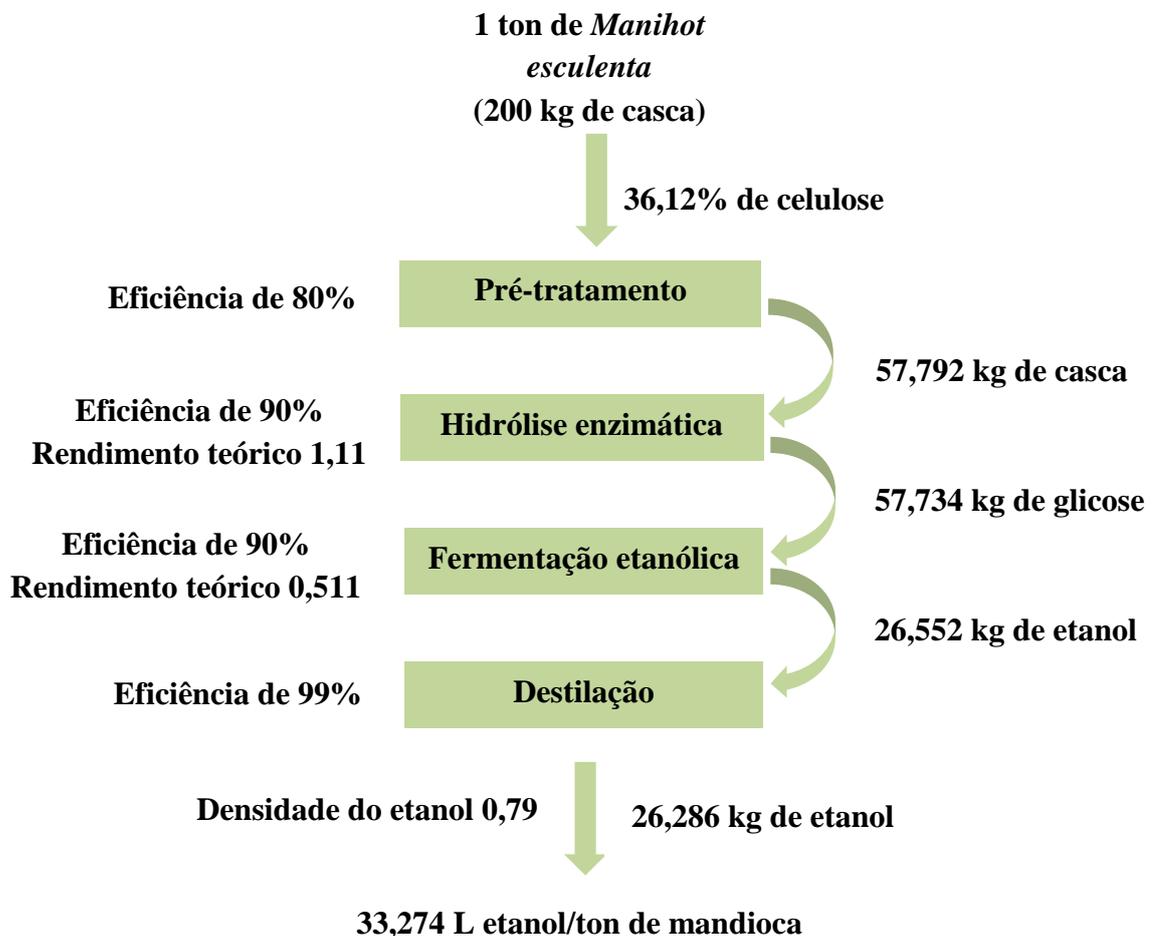
Pode-se ainda observar na tabela 9, que o consumo de glicose, em 1 hora de fermentação, foi de 21% para as casca/raiz e de 23% para o caule. Ao longo deste processo, o efeito de declínio continua tanto para a glicose como para a xilose em ambos os substratos, demonstrando que a produção de etanol está associada ao consumo dos açúcares pela *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 15a e b). O que se observa, nas 24 horas de fermentação, é consumo total da hexose nomeadamente por glicose. Quanto à pentose, foi reportado uma concentração de xilose residual de 0,04 e 0,10 g/L para casca/raiz e caule, respectivamente.

De acordo com Wang et al., (2008), maiores teores de etanol podem ser alcançados realizando a desproteínação dos materiais lignocelulósicos dos resíduos de *Manihot esculenta*. Uma vez que o teor de proteína resulta em menor quantidade de etanol, além de mudanças físicas no mesmo, como alteração na sua cor de incolor para amarelado.

Na figura 16, encontram-se as etapas do processo de produção de E2G bem como suas respectivas operações unitárias a partir da fração celulósica contida na biomassa gerada que é 200 kg, baseado em uma tonelada de casca/raiz de *Manihot esculenta* (SOUZA et al., 2015). Cabe ressaltar que o teor de celulose foi determinado neste estudo e que as demais etapas são concernentes a valores teóricos.

Ademais, considerando os valores semelhantes de E2G, produzido tanto pelo caule como pela casca, e dada a utilização do caule (manirva) para o replantio da cultura e sua quantidade de lignina, optou-se em realizar a simulação do processo descrito na figura 16 apenas com as cascas.

**Figura 16 – Potencial produtivo de etanol de segunda geração (E2G) a partir dos resíduos não comestíveis de *Manihot esculenta***



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Analisando o volume de etanol alcançado pelas cascas/raiz ilustrado na figura 16 (33,274 L), e se considerarmos os dados de produtividade de etanol a partir da polpa da mandioca que é de 104 litros de álcool em uma tonelada, é possível relatar que, os 33 litros de E2G, oriundos do resíduo lignocelulósico, está positivamente contribuindo com a matriz energética, além disto, pode-se afirmar que essa forma de gerar o E2G não irá competir com as áreas de cultivares alimentícios. Outro ponto positivo, é o reaproveitamento desses resíduos para geração de energia, minimizando dessa forma seu depósito e poluição no meio ambiente.

Anyanwn et al., (2015) relatam que a produtividade de 70 toneladas por hectare ao ano de açúcares, através da cana-de-açúcar, exige uma vasta quantidade de água durante seu desenvolvimento, gerando um fator limitante aos territórios de constantes estiagem. Em contrapartida, a mandioca possui grande habilidade em se desenvolver e crescer em regiões com longos períodos de secas, tornando-se uma cultura promitente às áreas impróprias para o cultivo da cana-de-açúcar (ANYANWU et al., 2015).

Segundos dados disponibilizados pela Embrapa (2016), a mandioca possui melhor desempenho em comparação a cana-de-açúcar, considerando o volume de etanol produzido em toneladas para cada biomassa. Sendo assim, tem-se para cada tonelada de cana-de-açúcar, 85 litros de etanol produzido. Enquanto que em uma tonelada de mandioca, produz 104 litros de etanol.

Nesse sentido, a produtividade de etanol a partir da casca/raiz promove um ganho de 32% no rendimento do processo, haja vista a soma da produção de etanol pela polpa da mandioca. Essa demanda de energia alternativa possível de ser gerada, contribui para ganhos econômicos no sistema de produção agroindustrial.

## 6 CONCLUSÃO

Os resíduos não comestíveis de *Manihot esculenta* apresentaram propriedades químicas típicas de materiais lignocelulósicos, mostrando-se adequados de acordo com as perspectivas futuras para o uso na produção de biocombustível, bem como outras aplicações industriais.

Considerando a quantidade de sólidos utilizados na hidrólise enzimática, o caule e as cascas/raiz apresentaram boa bioconversibilidade em açúcares fermentescíveis a cerca de 6,44 g/L e 7,56 g/L, respectivamente. Podendo dessa forma, serem processados com a maioria das biomassas na produção de biocombustível.

Em relação ao teor alcoólico, observou-se que a conversão dos açúcares em etanol, foi maior para o caule, cerca de 5,57 g/L, visto a presença de maior concentração de xilose neste resíduo, além da sua conversão pelas leveduras na fermentação.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* mostrou-se capaz de consumir a xilose e produzir etanol em concentrações muito próximas para os dois substratos sob as mesmas condições operacionais de fermentação.

Os resultados desse estudo apontam grande relevância e corroboram para o desenvolvimento de outros modelos operacionais, ampliando variações na hidrólise e fermentação para produção de etanol a partir de resíduos não comestíveis de *Manihot esculenta*.

## 7 PEDIDOS DE DEPÓSITOS DE PATENTES



10/12/2015 870150006586

13:50



00.000.2.2.15.0768063.0

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2015 030917 1

**Dados do Pedido**

---

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PRODUÇÃO DE ETANOL 2G OBTIDO DA CASCA DA MANIHOT ESCULENTA COMO FONTE DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

**Inventores:**

Jumelice dos Santos Silva (UFAL)  
Kledson Lopes Barbosa (UFAL)  
Profa. Dra. Renata Maria Rosas Garcia Almeida (UFAL)  
Profa. Dra. Valéria Rodrigues dos Santos Malta (UFAL)

**Resumo:** A presente invenção tem como objetivo produzir e propor ao mercado um produto competitivo aos combustíveis derivados do petróleo, por meio do processo de fermentação da biomassa pré-tratada e hidrolisada para a produção de etanol de segunda geração (E2G), utilizando cascas da *Manihot esculenta*. As etapas que constam até a produção do etanol 2G são: Caracterização físico-química, higienização com solução de hipoclorito 100ppm, secagem em estufa a 55 °C e trituração em liquidificador industrial para obtenção da farinha das cascas de *Manihot esculenta*, pré-tratamento com ácido sulfúrico, diluído nas concentrações 0,5%; 1,5% e 2,5%, quantificação dos açúcares redutores totais (ART), Glicose e Brix na fração líquida do pré-tratamento ácido, rendimento mássico na fração sólida, análise estatística da melhor resposta da sacarificação ácida (ART=93,23 g/L), sacarificação enzimática com o completo enzimático de celulases da Novozyme, fermentação alcóolica com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e determinação do teor alcóolico pelo método de dicromato de potássio. O volume de etanol 2G produzido nessa invenção foi de 6,93 g/L. O investimento na produção desse combustível renovável garante ao Brasil a largada na busca por fontes de energia renovável de alta qualidade, baixo custo de produção e sustentabilidade ambiental.



15/08/2016

870160043146

09:39



00.000.2.2.15.0858965.2

## Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 018606 4

### Dados do Pedido

---

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): ETANOL 2G E DERIVADOS OBTIDOS DO CAULE DE MANIHOT ESCULENTA (MANDIOCA)

#### Inventores:

Jumelice dos Santos Silva (UFAL)  
Kledson Lopes Barbosa (UFAL)  
Profa. Dra. Renata Maria Rosas Garcia Almeida (UFAL)  
Profa. Dra. Valéria Rodrigues dos Santos Malta (UFAL)  
Martha Suzana Rodrigues dos Santos (UFSCar)  
Prof. Dr. Antônio José Gonçalves da Cruz (UFSCar)  
Márcia Andréa Gomes (UFBA)

**Resumo:** A presente invenção tem como objetivo aumentar a produtividade de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos de *Manihot esculenta* por meio da incorporação do caule deste vegetal, via sacarificação enzimática e fermentação, beneficiando diretamente o ganho biotecnológico do produto. A viabilidade econômica é caracterizada por produzir, além do etanol de segunda geração, insumos químicos com diversas aplicações industriais que poderão ser utilizados na obtenção de produtos de maior valor agregado. O processo de produção de etanol, a partir do caule de *Manihot esculenta*, complementarará o rendimento energético obtido a partir das cascas desse vegetal. As etapas que constam até a produção do etanol 2G são: caracterização química, higienização com solução de hipoclorito 100 ppm, secagem em estufa a 55°C e trituração em liquidificador industrial para obtenção da farinha do caule de *Manihot esculenta*, pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído na concentração de 1,5%, hidrólise enzimática com o complexo enzimático Cellic® CTec2 (Novozymes), fermentação alcoólica com leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, finalizando com a determinação do teor alcóolico por cromatografia líquida de alta eficiência. O volume de etanol 2G produzido nessa invenção foi de 5,57 g/L.

## 8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Embora os resultados obtidos neste trabalho tenham sido expressivos, há necessidade de continuar com os estudos, objetivando um aumento na viabilidade destes resíduos frente à produção de etanol, especificamente:

- Hidrolisar a fração hemicelulósica, utilizando enzimas xilanases, com o objetivo de se obter um maior percentual de açúcares fermentescíveis na etapa da fermentação;
- Caracterizar fisicamente, após o pré-tratamento, os resíduos da *Manihot esculenta*, casca e caule, em relação às propriedades: grau de polimerização, cristalinidade, porosidade e área superficial, com a finalidade de avaliar a influência destas propriedades na etapa da hidrólise enzimática;
- Avaliar metodologias de destoxificação, uma vez que a mesma propõe transformar inibidores em compostos inativos ou reduzir suas concentrações, com o propósito de melhorar o desempenho na etapa de fermentação e consequentemente aumentar o rendimento final do processo.
- Desproteínizar os resíduos lignocelulósicos da *Manihot esculenta*.

## REFERÊNCIAS

- ADLER, P. R. et al. Biomass yield and biofuel quality of switchgrass harvested in fall or spring, **Agron. J.** 98 (6) 1518-1525, 2006.
- AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G.; Cellulosic Ethanol Production Using the Naturally Occurring Xylose Fermenting Yeast, *Pichia stipites*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, p. 1515-1524, 2008.
- AIGBODION, V. S. et al. Potential utilization of solid waste (bagasse ash). **Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering**, v. 9, n. 1, p. 67-77, 2010.
- ALVIM, J. C. et al. Biorrefinarias: Conceitos, classificação, matérias primas e produtos. **Journal of Bioenergy and Food Science**. Macapá, v.1, n. 3, p. 61-77, 2014.
- ALVIRA, P. Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review, **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, p. 163-173, 2014.
- ANYANWU, C. N. et al. Sustainability of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) as industrial feedstock, energy and food crop in Nigeria. **Renewable Energy**. v. 81, p. 745-752, 2015.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17th ed. Gaithersburg: Ed. William Horwitz, 2002.
- ASGHER, M.; AHMAD, Z.; IQBAL, H.M.N.; Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 488-495. 2013.
- ASGHER, M. et al. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56-66, 2014.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.
- BAPTISTA, C. M. S. G. et al. Natural immobilisation of microorganisms for continuous ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 127-131, 2006.
- BARBOSA, K. L. **Produção de Etanol 2G através de *Opuntia ficus-indica* utilizando *Saccharomyces cerevisiae* E *Kluyveromyces marxianus***. 2015. 79 f. 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.
- BI, C. et al. Expression of lignin biosynthetic genes in wheat during development and upon infection by fungal pathogens. **Plant Mol Biol Rep**. v. 29, p. 149-611, 2011.

- CARRASCO, C. et al. Fermentation of the Straw Material Paja Brava by the Yeast *Pichia stipitis* in a Simultaneous saccharification and Fermentation Process. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, v. 3, p. 99-106, 2013.
- CARRAZA, L. R.; ÁVILA, J. C. C.; SILVA, M. L. Manual tecnológico de aproveitamento integral do fruto e da folha do babaçu (*Attalea spp.*). **Brasília – DF. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPAN)**. Brasil, 2012.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA-JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quim. Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CGEE. **Química verde no Brasil: 2010-2030 - Ed. rev. e atual.** Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.
- CHANG, M. C. Harnessing energy from plant biomass. **Curr Opin Chem Biol**. v. 11, p. 677-684, 2007.
- CHEN et al. Study on chemical compositions of *Manihot esculenta* Crantz (*M. utilissima* Pohl) stalks, **Adv. Mater. Res.** v. 236-238, p. 394-398, 2007.
- CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O. Teor de cianeto total e livre nas etapas de processamento do tucupi. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.70, n.1, p. 41-46, 2011.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Levantamento de safra**. 2016. Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acesso em: 20 dez. 2016.
- COOK, B. et al. Global warming and 21st century drying. **Climate Dynamics**, v.43, p. 1-21, 2014.
- CORTEZ, L. A. B., **Bioetanol de cana-de-açúcar**. Ed. Blucher, v. 992, p. 2010.
- DAI, A. Increasing drought under global warming in observations and models. **Nature Climate Change** v. 3, p. 52-58, 2013.
- DIXON, R. A. et al. The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. **Mol Plant Pathol**. v. 3, p. 371-390, 2002.
- EL-MASHAD, H. M. Biomethane and ethanol production potential of *Spirulina platensis* algae and enzymatically saccharified switchgrass. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 119-127, 2015.
- EMBRAPA. Agência Embrapa de Informação e Tecnologia. **Etanol de Mandioca**. 2016. Disponível em : <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj1ma9r802wyiv802hvm3j8subzcro.html#>>. Acesso em: 22 dez 2016.
- EMODI, V. N.; YUSUF, S. D.; BOO, K. The necessity of the development of standards for renewable energy technologies in Nigeria. **Smart Grid and Renewable Energy**, v. 5, p. 259-274, 2014.

EPE, 2014. Empresa de Pesquisa Energética. **Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis**. Ano 2013. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br/Petroleo/Documents/An%C3%A1lise%20de%20Conjuntura%20dos%20Biocombust%C3%ADveis%20-%20boletins%20peri%C3%B3dicos/An%C3%A1lise%20de%20Conjuntura%20-%20Ano%202013.pdf>>. Acesso em: 26 maio 2016.

EPE, 2014. Empresa de Pesquisa Energética. **Nota Técnica DEA 15/14 – Inventário Energético de Resíduos Rurais. Série Recursos Energéticos**, Ano 2014. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br/mercado/Documents/S%C3%A9rie%20Estudos%20de%20Energia/DEA%2015%20-%202014%20-%20%20Invent%C3%A1rio%20Energ%C3%A9tico%20de%20Res%C3%ADduos%20Rurais.pdf>>. Acesso em: 28 nov 2016.

FAN, C. et al. Efficient ethanol production from corncob residues by repeated fermentation of an adapted yeast. **Bioresource Technology**, v.136, p. 309-315, 2013.

FAOSTAT – Agricultura. 2013. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Base de dados estatísticos**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/defaaut.aspx>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **EMBRAPA, Documentos 54**, 2011.

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

FIORDA, F. A.; SOARES JÚNIOR, M. S.; SILVA, F. A.; SOUTO, L. R. F.; GROSSMANN, M. V. E. Farinha de bagaço de mandioca: aproveitamento de subproduto e comparação com fécula de mandioca. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 43, n. 4, p. 408- 416, 2013.

GERLAND, P. et al. World population stabilization unlikely this century. **Science** v. 346, p. 234-237, 2014.

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

GOEDERT, W. J. **A mandioca no cerrado**. Orientações técnicas / editores técnicos, Josefino de Freitas Fialho, Eduardo Alano Vieira – Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011.

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v.32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

HAN et al. Bioethanol production from optimized pretreatment of cassava stem. **Korean J. Chem. Eng.**, v. 28, p. 119-125, 2011.

HE, X. et al. Analysis of life-cycle energy use and GHG emissions of the biomass-to-ethanol pathway of the coskata process under chinese conditions. **Low Carbon Economy**, v.3, p. 106-110, 2012.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1018 p, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2012). **Portal do IBGE**. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 5 jul. 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2015). **Portal do IBGE**. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 3 nov. 2016.

IJAZ, A. et al. Purification and kinetic characterization of statistically optimized cellulase produced from *Aspergillus niger*. **Romanian Biotechnological letters**, v. 19, n. 6, p. 9835-9845, 2014.

IQBAL, H.M.N. et al. Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2, p. 149-156. 2011.

IQBAL, H.M.N.; KYAZZE, G.; KESHAVARZ, T. Advances in valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: An overview. **BioResources**, v. 8, p. 3157-3176. 2013.

KARIM, R. A.; HUSSAIN, A. S.; ZAIN, A. M. Production of bioethanol from empty fruit bunches cellulosic biomass and Avicel PH-101 cellulose. **Biomass Conv. Bioref.** v. 4, p. 333-340, 2014.

KARP, S. G et al. Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: a review. **Braz. arch. biol. technol.** v.56 n.4, p. 679-689, 2013.

KEATING, J. D.; PANGANIBAN, C.; MANSFIELD, S. D. Tolerance and adaptation of ethanologenic yeasts to lignocellulosic inhibitory compounds. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 93, p. 1196-1206, 2006.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KUHAD, R. C. et al. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 4950-4962, 2011.

KULOYO, O. O. et al. *Opuntia ficus-indica* cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 30, p. 3173-3183, 2014.

KUMAR, A.; GAUTAM, A.; DUTT, D. Biotechnological Transformation of Lignocellulosic Biomass in to Industrial Products: An Overview. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 7, p. 149-168, 2016.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **J Ind Microbiol Biotechnol**. v. 35, p. 377-391, 2008.

KUMAR, U.; ARORA, A. S.; PARIKH, S. Sustainable synthesis of clean energy fuel Bioethanol low cost biomass resources. **International Journal of advance Research in Engineering, Science & Technology**, v. 2, ed. 2, 2015.

- LE, H. D.; THANONKEO, P.; LE, V. V. M. Impact of high temperature on ethanol fermentation by *Kluyveromyces marxianus* immobilized on banana leaf sheath pieces. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 171, p. 806-816, 2013.
- LEE, J. W.; LIM, W. S. **Influence of pretreatment condition on the fermentable sugar production and enzymatic hydrolysis of dilute acid-pretreated mixed softwood.** *Bioresource technology*, v. 140, p. 306-311, 2013.
- LENNARTSSON, P. R.; ERLANDSSON, P.; TAHERZADEH, M. J. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. **Bioresource Technology**, v. 165, p. 3-8, 2014.
- LIMA, C. S. S. et al. Characterization of acid hydrolysis of sisal. **Applied Energy**, v.102, p. 254-259, 2013.
- LIMA, F. C. S. et al. Chemical composition of the cashew apple bagasse and potential use for ethanol production. **Advances in Chemical Engineering and Science**, v. 2, p. 519-523, 2012.
- LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial** – outros coordenadores: Aquarone, E., Borzani, W. & Schmidell, W. São Paulo: EdgardBlücher, 2001.
- LOUNGLAWAN, P.; KHUNGAEW, M.; SUKSOMBAT, W.; Silage production from cassava peel and cassava pulp as energy source in cattle diet. **J. Animal Veterinary Adv.** v. 10, p. 1007-1011, 2011.
- MEJÍA, C. C.; GUTIÉRREZ, A. J.; EL-HALWAGI, M. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. **Process Safety and Environmental Protection**. v. 90, p. 189-202, 2012.
- MESA, L. et al. Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v. 175, p. 185-191, 2011.
- MIELENZ, J. R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. **Current Opinion in Microbiology**. v. 4, p. 324-329, 2001.
- MILANEZ, A. Y. et al. De promessa a realidade : como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar - uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. **Biocombustíveis BNDES setorial**, v. 41, p. 237-294, 2015
- MINMUNIN, J.; LIMPITIPANICH, P.; PROMWUNGKWA, A. Delignification of Elephant Grass for Production of Cellulosic Intermediate. **Energy Procedia**. v. 79, p. 220- 225, 2015.
- MOOD, S. H. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.
- MOTONE, K. et al. Direct ethanol fermentation of the algal storage polysaccharide laminarin with an optimized combination of engineered yeasts. **Journal of Biotechnology**, v. 231, p. 129-135, 2016.

NANDA, S. et al. Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 4, p. 157-191, 2014.

NANSSOU, P. A. K.; NONO, Y. J.; KAPSEU, C. Pretreatment of cassava stems and peelings by thermohydrolysis to enhance hydrolysis yield of cellulose in bioethanol production process. **Renewable Energy**, v. 97, p. 252-265, 2016.

NGUYEN, T. N. et al. Lignin biosynthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.): its response to waterlogging and association with hormonal levels. **BMC Plant Biol.** v.16, p.1-16, 2016.

NUNES, R. M. et al. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

NUWAMANYA, E. et al. Bio-ethanol production from non-food parts of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **AMBIO**, v. 41, p. 262-270, 2012.

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

OLIVEIRA, L. R.; BATISTA, R. D. Perspectivas e situação atual da produção de biocombustíveis. **Revista eletrônica de energia**, v. 5, n. 1, p. 32-42, 2015.

OLOFSSON, K.; RUDOLF, A.; LIDÉN, G. Designing Simultaneous Saccharification and Fermentation for Improved Xylose Conversion by a Recombinant Strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 134, n. 1, p.112-120, 2008.

ORLANDINI, P.; LIMA, L. R. Sinopse do gênero *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) no estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, v. 41, n. 1, p. 51-60, 2014.

OURA, E. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of Baker's yeast. I Factors affecting the type of metabolism. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 2, n. 6, p. 1197-1212, 1974.

PANDEY, S. Cellulases in conversion of lignocellulosic waste into second-generation biofuel. **International Journal of Advanced Research**, v. 3, edição 7, p. 392-399, 2015.

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

PEREIRA, S. C. et al. Physicochemical and morphological characterization of the whole sugarcane lignocellulosic biomass used for 2G ethanol production by spectroscopy and microscopy techniques. **Renewable Energy**, v. 87, p. 607- 617, 2016.

PIROTA, R. D. P. B. et al. Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. **Ciência Rural**, v. 45, n. 9, p. 1606-1612, 2015.

PITARELO, A. P. et al. P. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Quim. Nova**, v. 35, n. 8, p. 1502-1509, 2012.

POTTER, D. et al. Phylogeny and classification of Rosaceae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 266, n. 1, p. 5-43, 2007.

PRATTO, B. et al. Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugarcane Straw: Kinetic Study and Semi-Mechanistic Modeling. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 178, p. 1430-1444, 2016.

PRIOR, B. A.; KILIAN, S. G.; PREEZ, J. C. D. Fermentation of D-Xylose by the Yeasts *Candida shehatae* and *Pichia Stipitis*. **Process Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 21-32, 1990.

QUEIROZ, D.S; GOMIDE, J.A; MARIA, J. Avaliação da folha e do colmo de topo e base de perfilhos de três gramíneas forrageiras. 1. Anatomia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.1, p.61-68, 2000.

RENGSIRIKUL, K. et al. Biomass Yield , Chemical Composition and Potential Ethanol Yields of 8 Cultivars of Napiergrass ( *Pennisetum purpureum* Schumach .) Harvested 3-Monthly in Central Thailand. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, v. 3, p. 107-112, 2013.

RABELO, S. C. et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 2600-2607, 2011.

RYABOVA, O. et al. A novel family of hemicellulolytic  $\alpha$ -glucuronidase. **Febs Letters**, v. 583, n. 9, p. 1457-1462, 2009.

ROCHA, G. J. M. et al. **Resumos do 5<sup>th</sup> Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components**, Paraná, Brasil, 1997.

ROSA, S. E. S; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: Limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, n. 32, p. 117-156, 2009.

SALLA, D. A. et al. Avaliação energética da produção de etanol utilizando como matéria-prima a cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2516- 2529, 2009.

SANTIAGO, A. D et al. **Levantamento exploratório da cadeia produtiva da farinha de mandioca no agreste de Alagoas**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA MANDIOCA, 11., 2005, Campo Grande. Anais eletrônicos... Campo Grande: EMBRAPA, 2005. p. 1-4. Disponível em: < [http://www.cpao.embrapa.br/11cbm/\\_html/trabalhos/arquivoPDF/pasta62.PDF](http://www.cpao.embrapa.br/11cbm/_html/trabalhos/arquivoPDF/pasta62.PDF)>. Acesso em: 5 jul. 2016.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, 1004-1010, 2012.

SANTOS, J. R. A. et al. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 904- 908, 2010.

SANTOS, M. S.R. **Estudo de pré-tratamentos da palha e sabugo do milho visando a produção de Etanol 2G**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química).

Universidade Federal de Alagoas. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Centro de Tecnologia. Maceió, 2014.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.

SEPLANDE, SINC, DGEO, 2014. Secretaria de Estado do Planejamento e do Desenvolvimento Econômico de Alagoas; Superintendência de Produção da Informação e do Conhecimento; Diretoria de Geoprocessamento. **Quantidade produzida de mandioca (t) – 2012**. Disponível em: <<http://dados.al.gov.br/dataset/23bf502d-e3db-48d8-8d1b-06ee4f691bd7/resource/7a4d40f0-628f-4130-897c-14c68828510a/download>>. Acesso em: 25 maio 2015.

SHAHZADI, T. et al. Advances in lignocellulosic biotechnology : A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. **Advances in Bioscience & Biotechnology**, v. 5, p. 246-251, 2014.

SHEIKH, S. et al. Life cycle assesment of bio-ethanol fuel emissions for passenger cars in Houston area of Texas. **International Journal of Biological, Ecological and Environmental Sciences (IJBEES)**, v. 2, n. 5, p. 108-112, 2013.

SHIM, G. B.; A study on bio-ethanol extraction from fruit waste by simultaneous saccharification and fermentation. **APEC Youth Scientist Journal**, v. 7, n. 2, p. 154-162, 2015.

SILVA, A. C. M. S.; Estudo prospectivo dos resíduos gerados no processamento da mandioca. **Cad. Prospec.**, Salvador, v. 8, n. 2, p. 265-271, 2015a.

SILVA, C. E. F. **Avaliação do potencial de uso de resíduos do processamento de frutas na produção de etanol 2G**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Alagoas. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Centro de Tecnologia. Maceió, 2014.

SILVA, D. B. et al. Bioprospecção de linhagens de *trichoderma sp.* na degradação de resíduos lignocelulósicos de sabugo de milho. **Revista Verde**, v. 10, n.1, p. 252- 258, 2015.

SILVA, D. V. et al. Manejo de plantas daninhas na cultura da mandioca. **Planta daninha**, v. 30, n. 4, p. 901-910, 2012.

SILVA, J. S. **Avaliação do potencial de uso da casca da *Manihot esculenta* visando a produção de etanol 2G**. 2015b. 52 f. Monografia. (Graduação em Química Licenciatura) Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2015.

SINGH, R. et al. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 713-728, 2014.

SOUZA, J.E.A. **Avaliação das diversas fontes e tipos de biomassa do estado de Alagoas: Estudo de suas características físico – químicas e de seu potencial energético**. 2011. Tese

(Doutorado em Ciências) Universidade Federal de Alagoas. Programa de Pós – Graduação em Química e Biotecnologia. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2011.

SOUZA, S. O. et al. Resíduos de cascas de farinha do agreste alagoano: Perspectivas de utilização. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 9, p. 65-73, 2015.

STRUCTURAL BIOLOGY LABS. **Cellulose active enzymes**. Disponível em: <<http://xray.bmc.uu.se/~wimal/projects/research.html>>. Acesso em: 21 nov. 2016.

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.

VALLEJOS, M. E. et al. Kinetic study of the extraction of hemicellulosic carbohydrates from sugarcane bagasse by hot water treatment. **Industrial Crops and Products**, v. 67 p. 1-6, 2015.

VANHOLME, R. et al. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiol.** v.153, p. 895-905, 2010.

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

VAN VLEET, J. H., JEFFRIES, T. W. Yeast Metabolic Engineering for Hemicellulosic Ethanol Production. **Current Opinions in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 300- 306, 2009.

WANG, D. et al. Grain sorghum is a viable feedstock for ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**. v. 35, p. 313-320, 2008.

WATANABE, H.; TOKUDA, G. Cellulolytic Systems in Insects, **Annual Review Of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 609- 632, 2010.

WENZEL, G. E. **Bioquímica Experimental dos Alimentos**. São Leopoldo, R. S., Editora UNISINOS, 2001.

WU, C.H. et al. Sulfuric Acid Hydrolysis and Detoxification of Red Alga *Pterocladia capillacea* for Bioethanol Fermentation with Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, n. 9, p. 1245-1253, 2014.