

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

P

P

E

Q



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DA PRODUÇÃO CONJUNTA DE
CELULOSE E BIOETANOL PROVENIENTES DO
BAMBU VIA HIDRÓLISE ÁCIDA**

Anderson Emmanuel Silva Santos

Orientadores:

Dr. Nelson Medeiros de Lima Filho
Dr. Alexandre Ricardo Pereira Schuler

ANDERSON EMMANUEL SILVA SANTOS

**Estudo da produção conjunta de celulose e bioetanol provenientes do bambu
via hidrólise ácida**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos

Linha de Pesquisa: Processos Químicos Industriais

Orientadores: Prof. Dr. Nelson Medeiros
Prof. Dr. Alexandre Schuler

Recife
2016

Catálogo na fonte
Bibliotecária Valdicéa Alves, CRB-4 / 1260

- S231e Santos, Anderson Emmanuel Silva.
Estudo da produção conjunta de celulose e bioetanol provenientes do bambu via hidrólise ácida / Anderson Emmanuel Silva Santos - 2016.
128folhas. Il.; Tab.; Abr.; Sig.; e Simb.
- Orientador: Dr. Nelson Medeiros de Lima Filho.
Coorientador: Dr. Alexandre Ricardo Pereira Schuler.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2016.
Inclui Referências.
1. Engenharia Química. 2. Amido. 3. Bambu. 4. Hidrólise. 5. Biorrefinaria.
6. Bioetanol. I. Lima Filho, Nelson Medeiros de. II. Schuler, Alexandre Ricardo Pereira(Coordenador). III.Título.

UFPE

660.2CDD (22. ed.)

BCTG/2017 - 28

ANDERSON EMMANUEL SILVA SANTOS

**Estudo da produção conjunta de celulose e bioetanol provenientes do bambu
via hidrólise ácida**

Área de concentração:

Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos

Linha de pesquisa:

Processos Químicos Industriais

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, defendida e aprovada em 21 de outubro de 2016 pela banca examinadora constituída pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Nelson Medeiros de Lima Filho – Universidade Federal de Pernambuco
Orientador

Prof. Dr. Alexandre Ricardo Pereira Schuler – Universidade Federal de Pernambuco
Coorientador

Prof. Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha - Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Cesar Augusto Moraes de Abreu - Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Olga Martins Marques - Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho ao meu sobrinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a paz, saúde e discernimento necessários para conclusão deste trabalho.

Ao meu alicerce mor: minha família. Sr. José Manoel, D. Maria Azedete e minha irmã Andrezza Sandrelly, juntamente com meu sobrinho Lucas Kazuyuki que sempre acreditaram neste feito.

A minha namorada Danielly Divete, pessoa da qual vi de perto todo o esforço para a realização desta pesquisa que, ao final, com o apoio a mim cedido, acabou adquirindo um conhecimento razoável em práticas laboratoriais para uma bacharela em Direito.

Agradeço ao meu maior inspirador a seguir com meus estudos: o professor Dr. Alexandre Schuler, que, mais uma vez, me admitiu como seu aluno corroborando que a humildade é a maior porta para novos conhecimentos.

Ao professor Dr. Nelson Medeiros, pela sua disponibilidade, aconselhamentos e confiança no meu projeto.

A professora Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha pelos seus conhecimentos na área de biotecnologia, como também, sua sensibilidade feminina em se preocupar com o lado físico e emocional de seus alunos, algo que só uma mulher pode fazer com sutileza e maestria.

Ao Dr Valmir Félix de Lima e ao engenheiro Lauro Araripe Pereira Neto pelos momentos de descontração e '*bullying*' no laboratório de Cromatografia Instrumental da UFPE, mas principalmente, pelo o exímio conhecimento que ambos carregam em instrumentação analítica. A eles devo toda a parte que envolve cromatografia neste trabalho.

Ao quadro de técnicos de laboratório do Centro Acadêmico de Vitória, em especial a Ma. Geivianni Cavalcanti, Me. Silvio de Assis e ao Dr. Danilo Fontes, que contribuíram diretamente para este trabalho, assim como, a compreensão de Dionízio de Barros Jr. gerente da Yso da Vitória.

Aos colegas da turma de mestrado do DEQ: Nathália Padilha, Levy Paiva, Laís Alexandre, Jokderléa Corrêa, Brígida Villar, Natália Trindade e Vanessa Mendonça, por ter me ajudado cumprir a difícil tarefa das disciplinas com muita alegria e entusiasmo, transformando essa árdua tarefa em um fato motivacional.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

RESUMO

Devido aos problemas ambientais provenientes do petróleo e seus derivados, as matrizes energéticas sustentáveis oriundas de vegetais ganham cada vez mais espaço como o bioetanol no Brasil. Todavia, para serem ainda mais competitivos, os biocombustíveis necessitam de maior aproveitamento do vegetal, utilização de resíduos em seus processamentos e/ou aplicação do conceito de biorrefinarias. No Brasil, a indústria do bambu atualmente utiliza-o quase que apenas para obtenção de celulose, entretanto, o teor de extrativos tais como o amido contido nessa gramínea, demonstra desvantagem operacional e para o meio ambiente perante outras madeiras com a mesma finalidade. Devido a este fato, esta pesquisa teve o objetivo de estudar a produção de bioetanol através do amido contido no colmo do bambu para a produção de açúcares e posterior fermentação alcoólica, na tentativa de aplicação do conceito de biorrefinaria celulose/bioetanol. Para a remoção do amido utilizou-se colmos processados da espécie *Bambusa vulgaris* que foram submetidos a tratamentos com água quente em sistema aberto e semiaberto, a este último, foi acrescido 1 kgf/cm² de pressão. Para sacarificação do amido diretamente na biomassa vegetal seguiu-se um planejamento fatorial 2³ com diferentes concentrações de ácido sulfúrico diluído, tempo de reação e forma da biomassa como variáveis independentes e o teor de açúcares redutores totais pelo método DNS como variável de resposta. Após identificação do ponto ótimo do processo através da análise de variâncias ANOVA, desenvolveu-se um sistema *flash* com recuperação de vapor com a finalidade de mitigar e recuperar o furfural e 5-hidroximetilfurfural, subprodutos da hidrólise ácida com valor comercial e inibidores de fermentação. Mediante a um sistema fechado simulado em frasco hermeticamente fechado em autoclave comparou-se a eficiência do *flash*. As biomassas residuais de alguns experimentos foram reservadas e caracterizadas juntamente a biomassa vegetal *in natura* e compararam-se os resultados. O extrato hidrolisado obtido do bambu, após pré-preparo a mosto, foi fermentado paralelamente a uma fermentação de mosto padrão de glicose e foram calculados seus parâmetros e perfis cinéticos. Os resultados obtidos evidenciaram que, devido a matriz, houve dificuldades em remover o amido do bambu de forma direta pelos métodos adotados, assim como, quantificá-lo com exatidão. Entretanto, pelo sistema de recuperação de vapor desenvolvido, é possível reduzir com o *flash* 36% de furfural e 46,59% de 5-hidroximetilfurfural no extrato hidrolisado mostrando-se promissor o sistema elaborado. Foi possível obter no extrato hidrolisado, após sua suplementação com nutrientes, bioetanol com rendimento de 26,5% na sua fermentação utilizando a levedura *S.cerevisiae*. Constatou-se que alguns aspectos das biomassas analisadas foram alterados após os tratamentos hidrotérmicos e com a caracterização que, além do amido, apenas a hemicelulose do bambu foi hidrolisada, tornando-se plausível a ideia de produção conjunta de celulose e bioetanol.

Palavras-chave: amido, bambu, hidrólise, biorrefinaria, bioetanol

ABSTRACT

Due to environmental problems from oil and its derivatives, sustainable energy matrices derived from vegetables, such as bioethanol, are becoming more and more common in Brazil. However, to be even more competitive, biofuels require greater use of vegetable waste, used in their processing and / or application of the concept of biorefineries. In Brazil, bamboo industry is currently used almost only for pulping, however, the extractives content such as starch contained in this grassy material shows operational disadvantage for the environment and against other wood for the same purpose. Due to this fact, we tried to develop this research in order to take advantage of the starch in the bamboo stalk to produce sugars and subsequent fermentation in an attempt to apply the concept of biorefinery cellulose / bioethanol. To remove the starch, a process with the stems of the species *Bambusa vulgaris* was used, subjecting them to hot water treatment open and semi-open system, the latter was added 1 kgf / cm² pressure. For starch saccharification directly in the plant biomass followed a factorial design 2³ with different concentrations of sulfuric acid diluted, reaction time and form of biomass as independent variables and the content of total reducing sugars by DNS method as the response variable. After identification of the optimal point in the process using ANOVA variance analysis, A vapor recovery flash system was developed in order to mitigate and recover furfural and 5-hydroxymethylfurfural, acid hydrolysis by-products of commercial value and fermentation inhibitors. Upon simulated in a closed system hermetically sealed bottle in an autoclave compared to flash efficiency. The residual biomass of some experiments have been reserved and assigned along the vegetal biomass in nature and compared the results. The hydrolyzate broth obtained from bamboo, after pre-preparation the wine was fermented in parallel with a standard wine fermentation of glucose and were calculated in its parameters and kinetic profiles. The results showed that, because of the matrix, there were difficulties in removing the starch from bamboo directly by the methods adopted, as well as quantify it exactly. However, by the developed steam recovery system, you can reduce the flash with 36% of furfural and 46.59% of 5-hydroxymethylfurfural in the hydrolyzed extract showing the elaborated system promising. It was possible to obtain in the hydrolyzed extract, after its nutrient supplementation, bioethanol with a yield of 26.5% in its fermentation using yeast *S.cerevisiae*. It was found that some aspects of the analyzed biomasses were changed after hydrothermal treatment and the characterization, in addition to starch, hemicellulose only bamboo was hydrolyzed, making it plausible idea of joint production of cellulose and ethanol.

Keywords: starch, bamboo, hydrolysis, biorefinery, bioethanol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produção mundial de biocombustíveis 1975 - 2006 (Milhões de litros)	21
Figura 2	Projeção de consumo de álcool carburante no Brasil (2008-2017)	24
Figura 3	Evolução da venda de veículos a etanol hidratado e sua participação na venda de carros novos	24
Figura 4	Projeção total das exportações brasileiras de etanol	25
Figura 5	Estrutura da parede celular dos vegetais	28
Figura 6	Estrutura molecular da celulose	29
Figura 7	Representação esquemática da organização das cadeias de celulose	30
Figura 8	Alguns componentes da fração hemicelulose	30
Figura 9	Estrutura de xilana de plantas anuais e perenes	31
Figura 10	Unidades precursoras da lignina	33
Figura 11	Estrutura da lignina	34
Figura 12	Bambuzal nativo na cidade de Salvador – BA	35
Figura 13	Partes do bambu	37
Figura 14	Diferentes tipos de rizomas	37
Figura 15	Colmos de bambu	38
Figura 16	Partes do colmo do bambu	39
Figura 17	Corte transversal do colmo	39
Figura 18	Fluxograma proposto de uma biorrefinaria conjunta a produção de celulose a partir do bambu	44
Figura 19	Estrutura dos componentes do amido	46
Figura 20	Conformação espacial helicoidal da amilose	47
Figura 21	Fotomicrografia com aumento de 200 vezes de grânulos de amido	47
Figura 22	Hidrólise ácida de 4-O-metilglucuronoxilano (composto da hemicelulose) e Celulose	52
Figura 23	Etapas da hidrólise da amilose	55
Figura 24	Via metabólica da fermentação de etanol em <i>S. cerevisiae</i>	57
Figura 25	Rendimento teórico da fermentação anaeróbia	59

Figura 26	Curva típica de crescimento da levedura	61
Figura 27	Fluxograma geral do estudo realizado	62
Figura 28	Triturador utilizado para os colmos do bambu	63
Figura 29	Colmos do bambu após trituração em cavacos	64
Figura 30	Colmos do bambu após pulverização	64
Figura 31	Bambu em cavaco antes e depois do desfibramento	67
Figura 32	Reator confeccionado para os experimentos com manômetro em destaque	67
Figura 33	Esquema de quantificação do teor de extrativos	76
Figura 34	Montagem do cartucho para a remoção de extrativos	76
Figura 35	Equipamento de Soxhlet	77
Figura 36	Montagem da válvula para recuperação de vapor	80
Figura 37	Sistema de recuperação de furfural e 5-HMF	80
Figura 38	Sistema de fermentação anaeróbia adotado	82
Figura 39	Fluxograma do tratamento da coleta da fermentação	83
Figura 40	Gráficos que representam o modelo de Luedeking & Piret (1959)	85
Figura 41	Teste do iodo realizado em uma extração com água contendo amido	86
Figura 42	Aspecto do teste quantitativo de amido por Figueira e Hirooka (2000)	87
Figura 43	Percentual (g/g) do teor de amido removido ao longo das extrações	88
Figura 44	Biomassa vegetal antes e após a hidrólise ácida	89
Figura 45	Fração líquida (extrato) após a hidrólise ácida no bambu	90
Figura 46	Gráfico com identificação do ponto ótimo da hidrólise	93
Figura 47	Fibras ampliadas (100x) do bambu <i>in natura</i> com contraste de iodo a 1% (v/v)	98
Figura 48	Fibras ampliadas (100x) do bambu tratadas com solução de H ₂ SO ₄ 2% (v/v)	98
Figura 49	Fibras ampliadas (100x) do bambu tratadas com solução de H ₂ SO ₄ 5% (v/v)	99
Figura 50	Fibras ampliadas (100x) do bambu após a 26ª extração para a remoção do amido no sistema semiaberto sob pressão	99

Figura 51	Células de parênquimas da amostra <i>in natura</i> com a presença de grânulos de amido	100
Figura 52	Células de parênquimas da amostra tratada com solução de H ₂ SO ₄ 2% (v/v)	100
Figura 53	Células de parênquimas da amostra tratada com solução de H ₂ SO ₄ 5% (v/v)	101
Figura 54	Células de parênquimas da amostra após 26 ^a extração para a remoção do amido no sistema semiaberto sob pressão	101
Figura 55	Fibras de bambu proveniente de diferentes amostras	102
Figura 56	Curva da TGA das amostras realizadas	103
Figura 57	Extrato proveniente da hidrólise ácida do bambu com pH menor que 1 e igual a 5	105
Figura 58	Filtração do extrato hidrolisado de bambu com pH ajustado	105
Figura 59	Precipitado formado no mosto de bambu estéril	106
Figura 60	Comportamento do inóculo de levedura no mosto de bambu	106
Figura 61	Sistema de fermentação com agitação magnética	107
Figura 62	Arranjo em cacho da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	107
Figura 63	Perfil cinético do mosto padrão	110
Figura 64	Perfil cinético do mosto de bambu	111
Figura 65	Perfil de formação de produto em relação ao aumento da biomassa celular	112
Figura 66	Comparação entre o etanol proveniente do bambu e cana-de-açúcar	113

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Teor de constituintes em biomassas vegetais	28
Tabela 2	Teor de constituintes em biomassa de bambu	42
Tabela 3	Proporção dos diversos produtos da fermentação alcoólica, em g/100g de glicose metabolizada, de acordo com várias fontes e para diferentes eficiências fermentativas	59
Tabela 4	Variáveis independentes do planejamento fatorial 2 ³	69
Tabela 5	Explicação na concentração da solução hidrolisante	69
Tabela 6	Nutrientes adicionados aos mostos	81
Tabela 7	Teor de amido removido por extração com água quente sem pressão	87
Tabela 8	Teor de amido removido por extração com água quente e pressão de 1 kgf/cm ²	89
Tabela 9	Resultados do fatorial 2 ³ dos teores de açúcares redutores totais	90
Tabela 10	Resultados de ART em relação ao Tempo para o ANOVA	91
Tabela 11	Resultados de ART em relação à Concentração da Solução de H ₂ SO ₄ para o ANOVA	91
Tabela 12	Resultados de ART em relação à Forma para o ANOVA	91
Tabela 13	Teste de variância ANOVA aplicado	91
Tabela 14	Ensaio realizado variando-se a Concentração da Solução de H ₂ SO ₄	92
Tabela 15	Teste de variância ANOVA aplicado aos valores agrupados	92
Tabela 16	Ordem de eficiência das soluções ácidas nas obtenções de ART	92
Tabela 17	Teores de furfural e 5-HMF em sistema com e sem <i>flash</i>	95
Tabela 18	Teores em percentual da composição das biomassas vegetais analisadas	96
Tabela 19	Perda de massa em percentual na TGA	103
Tabela 20	Resultados cinéticos da fermentação	108
Quadro 1	Principais diferenças entre celulose e hemicelulose	32
Quadro 2	Principais diferenças entre os bambus herbáceos e lenhosos	36
Quadro 3	Parâmetros e metodologias adotadas para a caracterização da biomassa vegetal	70
Quadro 4	Regime de coleta na fermentação	83

Quadro 5	Representação de α e β para o modelo Luedeking e Piret (1959)	85
Quadro 6	Considerações para o balanço de material final	112

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

°C – grau Celsius

5-HMF – 5-Hidroximetilfurfural

ADP – adenosina difosfato

ANOVA – análise de variância

ART – açúcares redutores totais

ATP – adenosina trifosfato

EU – União Européia

EUA – Estados Unidos da América

g – grama

g/g – relação grama por grama

g/L – relação grama por litro

g/mol – relação grama por mol

h – hora

H⁺ e H₃O⁺ – íon hidrônio

kcal – quilocaloria

kgf/cm² – relação de quilograma força por centímetro quadrado

K_M – constante de Monod

L – Litro

L/g.cm – litro por grama centímetro

m/v – relação massa por volume

MEV – microscopia eletrônica de varredura

mm – milímetro

NaOH – hidróxido de sódio

nm – nanômetro

pH – potencial hidrogeniônico

RPM – rotações por minutos

t – tonelada

TGA – análise termogravimétrica

v/v – relação volume por volume

“ – polegadas

® – marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1 HISTÓRICO	20
3.1.1 O Petróleo: Limitações, Meio Ambiente e Novas Alternativas	20
3.1.2 Biocombustíveis	21
3.1.3 Biocombustíveis no Brasil	22
3.1.4 Resíduos Agroindustriais: Fonte de Energia Economicamente e Ambientalmente Promissora	26
3.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	27
3.2.1 Aspectos Gerais	27
3.2.1.1 Celulose	29
3.2.1.2 Hemicelulose	30
3.2.1.3 Lignina	32
3.2.1.4 Outros Compostos	34
3.3 O BAMBU	35
3.3.1 Generalidades	36
3.3.2 Aspectos Agroeconômicos	40
3.3.3 Biorrefinarias: Uma Nova Perspectiva para o Bambu	42
3.4 PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE BAMBU	45
3.4.1 Amido	45
3.4.2 Liberação do Amido	49
3.4.3 Hidrólise Ácida	50
3.4.3.1 Generalidades, Interferentes e Subprodutos	50
3.4.3.2 Hidrólise do Amido	54
3.4.4 Fermentação Alcoólica	56
4 MATERIAIS E MÉTODOS	62

4.1 MATÉRIA-PRIMA	63
4.2 REMOÇÃO DO AMIDO	65
4.2.1 Extração com Água	65
4.2.1.1 Pré-Avaliação na Decocção do Bambu em Sistema Aberto.....	65
4.2.1.2 Decocção do Bambu em Sistema Semiaberto Sob Pressão.....	66
4.2.2 Extração e Sacarificação por Hidrólise Ácida	68
4.2.2.1 Hidrólise em Sistema Semiaberto Sob Pressão	68
4.2.2.2 Hidrólise em Sistema Fechado no Ponto Ótimo (Teste de Eficiência do Flash)	70
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL.....	70
4.3.1 Celulose e Hemicelulose	71
4.3.2 Lignina Total	72
4.3.3.1 Lignina Insolúvel.....	73
4.3.3.2 Lignina Solúvel	74
4.3.3 Cinzas	75
4.3.4 Extrativos Totais.....	75
4.3.4.1 Extrativos em Hexano:Etanol 1:1 (Solvente Apolar).....	76
4.3.4.2 Extrativos em Água Quente (Solvente Polar)	77
4.3.4.3 Extrativos em Água Quente após Hexano:Etanol 1:1.....	78
4.3.5 Umidade	78
4.3.6 Microscopia Óptica	79
4.3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	79
4.3.8 Análise Termogravimétrica (TGA).....	79
4.4 SISTEMA DE RECUPERAÇÃO DE FURFURAL E 5-HMF.....	79
4.5 FERMENTAÇÃO	81
4.5.1 Preparação do Mosto	81
4.5.2 Processo Fermentativo	81
4.5.3 Parâmetros Cinéticos.....	83
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	86
5.1 REMOÇÃO DO AMIDO.....	86
5.1.1 Pré-Avaliação na Decocção do Bambu em Sistema Aberto	86
5.1.2 Decocção do Bambu em Sistema Semiaberto Sob Pressão	87

5.1.3 Extração e Sacarificação por Hidrólise Ácida	89
5.1.4 Hidrólise em Sistema Fechado no Ponto Ótimo (Eficiência do <i>Flash</i>)	94
5.1.5 Sistema de Recuperação de Furfural e 5-HMF.....	94
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA	95
5.2.1 Composição	95
5.2.2 Microscopia Óptica	97
5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	99
5.2.4 Análise Termogravimétrica (TGA).....	103
5.3 SISTEMA DE RECUPERAÇÃO DE FURFURAL E 5-HMF	104
5.4 FERMENTAÇÃO	105
5.4.1 Preparação do Mosto de Bambu.....	105
5.4.2 Processo Fermentativo	106
5.4.3 Parâmetros Cinéticos.....	108
5.5 BALANÇO MATERIAL FINAL	112
6 CONCLUSÕES	114
REFERÊNCIAS	116

1 INTRODUÇÃO

As crescentes demandas da sociedade de consumo nos países desenvolvidos e emergentes ameaçam os recursos naturais do planeta, criando uma necessidade urgente de um novo caminho de industrialização, baseado em novas tecnologias de produção e consumo, com utilização racional de recursos e baixa poluição ambiental (WORLD WATCH INSTITUTE, 2006).

Oliveira (2009) explica que mesmo as reservas de combustíveis fósseis podem abastecer as necessidades energéticas por um período relativamente alto, as fontes exploráveis de petróleo crescem em uma proporção menor que seu consumo, assim como, os custos cada vez altos para sua extração e concentração em países do Oriente Médio em constantes crises políticas e sociais, favorece as pesquisas para sua completa substituição como matéria-prima para a produção de bens de consumo.

Além da instabilidade política gerada pela concentração da produção desse insumo energético, o impacto ambiental dos combustíveis fósseis tornou-se uma grande preocupação na sociedade moderna, sendo estes responsáveis por uma parcela significativa da emissão dos principais gases que contribuem para o aquecimento global (IPCC, 2007).

Por todas estas questões econômicas, geopolíticas e ambientais apresentadas, as atenções do mundo se voltam para fontes alternativas de energia, em especial para os biocombustíveis, como o etanol (UNEP, 2009).

Pandey *et al.* (2000) esclarecem que há uma crescente busca para uma maior utilidade para os resíduos agroindustriais como bagaços, farelos, polpas, entre outros, visto que, vários processos estão sendo desenvolvidos para a transformação desses resíduos em produtos com valor agregado tais como álcool, enzimas, ácido orgânicos e aminoácidos, entretanto, os bioprocessos estão se mostrando a alternativa mais promissora para esses fins e minimizando a poluição.

A descoberta de novos tratamentos dos materiais lignocelulósicos¹ é vista com bons olhos do ponto de vista econômico, considerando a sua utilização como substrato em processos para produção de etanol (KRISHNA *et al.*, 2001). Reações hidrotermais em recipientes com água quente pressurizada, produz uma eficiente

¹ Materiais provenientes da biomassa vegetal contendo em sua composição celulose, hemicelulose, lignina e outras substâncias.

separação dos carboidratos, hemiceluloses e celuloses existentes nas lignoceluloses das plantas por meio de reações de hidrólise (MOCHIDZUKI *et al.*, 2003).

Atualmente, estima-se que em todo o Brasil sejam produzidas anualmente por volta de 150 mil toneladas de celulose de bambu (SANTI, 2015). Azzini *et al.* (1987b) esclarecem que o menor rendimento em fibras celulósicas advindas do bambu como matéria-prima, se comparado com madeiras de eucalipto e pinus, é atribuído diretamente ao elevado teor de amido nele presente, concomitante a outro ponto negativo: o maior consumo de reagentes no cozimento quando processado convencionalmente em forma de cavacos.

Neste sentido, Azzini (1983) e Azzini e Gondim-Tomaz (1996), corroboram que a produção conjunta de celulose e amido é uma necessidade de otimização do processo, pois, ainda reduziria o consumo de reagentes químicos, a viscosidade e densidade dos efluentes líquidos gerados facilitando assim seu manejo.

Além disso, segundo Silvério *et al.* (2006) e Zhang *et al.* (2007), os extrativos como o amido e outros, provenientes da indústria de papel e celulose, podem gerar uma série de problemas no maquinário fabril. Christianson-Heiska *et al.* (2008); Kamaya, Tokita e Suzuki (2005) e Leiviskä e Rämö (2008), afirmaram que se lançados no ambiente aquático, podem vir a causar desequilíbrio severo na fauna aquática mesmo em concentrações baixas.

Foekel e Kleine (2012) explicam que o bambu armazena sua reserva energética em forma de amido, e este acúmulo se acelera a partir do seu segundo ano de vida. Surmely *et al.* (2003) descrevem que o amido é um polímero longo composto apenas de um monossacarídeo, glicose, e é necessária a hidrólise para quebra das ligações glicídicas, estas por sua vez, ocorrem basicamente de duas formas: ácida ou enzimática, ambas hidrólises, possuem a finalidade de transformar o amido em monossacarídeos.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivos remover e hidrolisar, por via ácida sob calor e pressão de 1 kgf/cm², o amido contido no bambu, avaliar as condições da biomassa vegetal após a reação e obter etanol do extrato hidrolisado (mosto de bambu) por via fermentativa, sendo este último produzido demonstrando-se seu perfil cinético.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo hidrolisar o amido contido no bambu, sem atingir a celulose, para formação de açúcares redutores e realizar suas fermentações pela levedura *Saccharomyces Cerevisiae*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a viabilidade da extração do amido obtida com água quente em sistema aberto sem pressão e com água quente em sistema semiaberto sob pressão de 1 kgf/cm²;
2. Realizar hidrólises ácidas, seguindo um planejamento fatorial, na biomassa vegetal do bambu sob calor e pressão de 1kgf/cm² e avaliar qual o ponto ótimo de produção de açúcares redutores totais;
3. Mensurar os teores de furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) no ponto ótimo de hidrólise e desenvolver condições para minimiza-los e comparar a eficiência do processo de remoção;
4. Caracterizar a biomassa vegetal antes e depois dos diferentes tratamentos hidrotérmicos e avaliar se houve ataque à celulose e a outros compostos;
5. Realizar uma fermentação, em batelada, do extrato proveniente da hidrólise do bambu (mosto de bambu) *versus* uma fermentação contendo glicose com substrato (mosto padrão) utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
6. Calcular e comparar os parâmetros cinéticos das fermentações realizadas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 HISTÓRICO

3.1.1 O Petróleo: Limitações, Meio Ambiente e Novas Alternativas

A dimensão da importância que o petróleo adquiriu pôde ser vista com a crise do petróleo, que elevou os preços em mais de 300% entre 1973 e 1974, porque os países do Oriente Médio descobriram que o petróleo é um bem não renovável e que, por isso, iria acabar algum dia. Os produtores de petróleo então diminuíram a produção, elevando o preço do barril de US\$ 2,90 para US\$ 11,65 em apenas três meses (BIOBRASDIESEL, 2011).

Além do problema iminente de esgotamento por conta da crescente demanda, os combustíveis fósseis são responsáveis por um grande dano ao meio ambiente visto que, exemplos como o efeito estufa, causado pela grande emissão de dióxido de carbono na atmosfera e o grande vazamento de petróleo ocorrido no Golfo do México em 2010, este despejou em torno de 4 milhões de barris de petróleo no oceano (VEJA, 2011).

Com esses riscos inerentes ao petróleo surgiu a possibilidade de fontes renováveis de energia, a partir daí foram criadas as mais diversas matrizes energéticas como a eólica, solar, geotérmica e agrícola, a esta última enquadra-se os biocombustíveis. No entanto, para serem bem sucedidas, as fontes alternativas precisam ser economicamente viáveis (SANTOS, 2011).

Nesse viés, Teixeira e Rodrigues (2012) ressaltam que os biocombustíveis provenientes da biomassa ganham importância nessa corrida, pois, podem ser produzidos a partir de vegetais e carregam consigo a chancela de economicamente sustentáveis, reduzem a emissão de gases e seus efeitos acumulativos com a ampliação dos cultivos. Por serem renováveis, confronta a futura redução das reservas de petróleo e, com isso, são fortes candidatos a complementar ou substituí-lo na matriz energética mundial.

3.1.2 Biocombustíveis

Os biocombustíveis são combustíveis produzidos a partir de fontes renováveis (biomassa), seja esta produzida especificamente com esse propósito, nos chamados cultivos energéticos – "Biocombustíveis de primeira geração" – ou obtida a partir de resíduos orgânicos de algum processo, caracterizando-a biomassa residual – "Biocombustíveis de segunda geração" (UNEP, 2009).

Biomassa é definida como qualquer matéria orgânica de origem vegetal, seja esta cultivada em terra ou em água, proveniente de produtos animais e seus resíduos, subprodutos de processamentos agrícolas e industriais, plantas aquáticas, resíduos agrícolas e agroindustriais, resíduos de papel e madeira, entre outros, incluindo os resíduos urbanos (NREL, 2011).

Nos dias de hoje, a substituição gradual do petróleo (Figura 1) por fontes de energia alternativas oriundas de biomassas renováveis é vista como um importante contribuinte para o desenvolvimento de uma sociedade industrial sustentável e eficaz quanto aos problemas ambientais (RAGAUSKAS *et al.*, 2006).

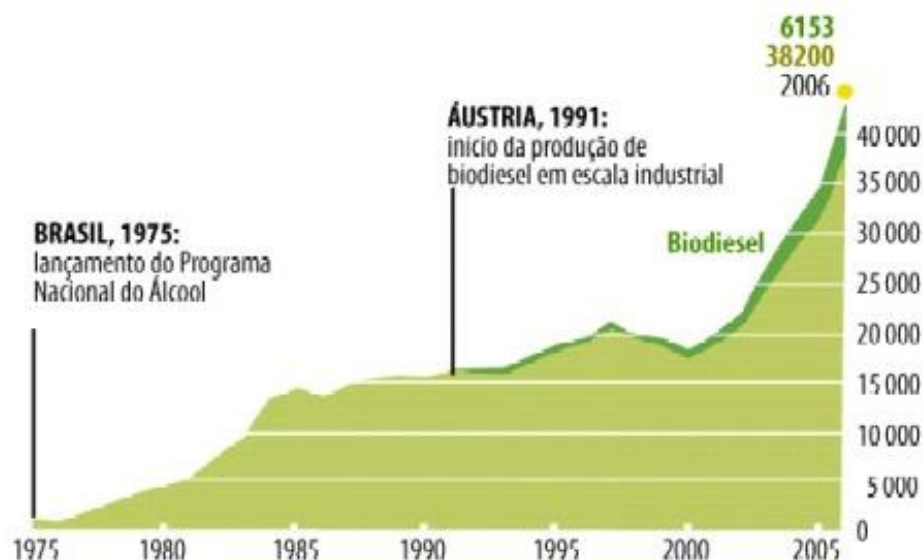


Figura 1 - Produção mundial de biocombustíveis 1975 – 2006 (Milhões de litros)

Fonte: <http://rede.novaescolaclub.org.br/sites/default/files/importadas/img/plano-de-aula/ensino-fundamental/producao-biocombustiveis.jpg>

adaptado de VITAL SIGNS 2007-2008 WORLDWATCHINSTITUTE; F.O.LIGHT

Neste sentido, Santos (2011) ressalta que o biodiesel é um biocombustível economicamente atraente, pois, além de poder substituir 100% o diesel de petróleo,

pode ser produzido pelo processo de transesterificação² de oleaginosas³, rejeitos como óleo usado em frituras e gordura animal exsudada em abatedouros e fábricas de embutidos, porém, obtém-se glicerina impura como rejeito.

Jank (2009) explica que o etanol voltou a alcançar um patamar de destaque no cenário energético no país e no mundo, pois, carrega consigo o sinônimo de biocombustível (combustível renovável) e menos poluidor que os derivados do petróleo, constatado pelo aumento mundial do seu consumo em quatro vezes nos últimos 10 anos.

Uma visão realista projeta que mais de 10% de toda a gasolina usada no mundo possa ser substituída por biocombustíveis nos próximos 15 - 20 anos e a demanda de energia está projetada para crescer mais de 50% até 2025, em grande parte decorrente do crescimento de países em rápido desenvolvimento, levando assim à necessidade de um aumento significativo da produção de etanol (ALPER; STEPHENOPOULOS, 2009; GOLDEMBERG; NIGRO; COELHO, 2008).

O uso específico da cana-de-açúcar, milho e outros produtos agrícolas para obtenção de álcool pode causar uma possível problemática no suprimento alimentício pelo crescimento da população mundial, entretanto a expansão no uso de resíduos agroindustriais é visto como uma alternativa a esta situação (PRIMO-YÚFERA *et al.*, 1995). Cinelli (2012) cita que nos Estados Unidos o aumento do uso do milho para produção de etanol implica na elevação do preço do cereal para os pecuaristas e setores de exportação.

3.1.3 Biocombustíveis no Brasil

O Brasil trabalha duas variantes desses combustíveis renováveis. A primeira, é a produção de biodiesel a partir de oleaginosas diversas, que se encontra em uma fase incipiente de desenvolvimento, não tendo ainda sustentabilidade econômica própria, pois depende de iniciativas de subsídio e valoração de externalidades aos processos para ser considerada viável; e a segunda, é a do etanol produzido da cana-de-açúcar, que já se constitui em um produto economicamente viável e com grandes perspectivas de mercado (TEIXEIRA; RODRIGUES, 2012).

² Reação química que envolve o óleo vegetal ou gordura animal com um álcool simples, na presença de um catalisador alcalino.

³ Vegetais com grande concentrações de óleos em seus frutos e/ou sementes.

O uso energético de óleos vegetais no Brasil foi proposto em 1975, originando o Pró-óleo – Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos. Seu objetivo era gerar um excedente de óleo vegetal capaz de tornar seus custos de produção competitivos com os do petróleo. Prevvia-se uma mistura de 30% de óleo vegetal no óleo diesel, com perspectivas para sua substituição integral em longo prazo (BIODIESELBR, 2010). No início de 2005, o Biodiesel foi introduzido na matriz energética brasileira através da Lei 11.097. De acordo com esta foi fixado em 5%, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição do biocombustível ao óleo diesel petroquímico comercializado em qualquer parte do território nacional até 2013 (SANTOS, 2011). A lei 13.033/2014 expandiu para 10% o volume até 2019.

No entanto, a prioridade política foi concedida, naquele momento, para o desenvolvimento do programa do álcool (PROÁLCOOL), que teve seu auge a meados da década de 80. A complexidade de montar um programa de produção, processamento e distribuição do combustível alternativo, sem o apoio oficial, determinou que a crise transcorresse sem que o programa de combustíveis alternativos para o diesel fosse implantado (PLÀ, 2003).

No Brasil, o etanol é produzido a partir da cana-de-açúcar. Hoje o Brasil é o segundo maior produtor mundial, seu custo é competitivo e foi conseguido em cerca de 30 anos decorridos desde a criação do Proálcool, programa lançado no país em meados da década de 1970 para reduzir a dependência da importação de petróleo. A tecnologia utilizada para produzir o etanol é madura e envolve a fermentação de açúcares, como sacarose e glicose, provenientes da cana-de-açúcar, geralmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Nos Estados Unidos, maior produtor mundial de etanol, o principal insumo para a sua produção tem sido o amido de milho, o programa é mais recente e suas justificativas são a substituição de aditivos promotores de octanagem na gasolina automotiva e a redução das emissões de gases do efeito estufa (CINELLI, 2012).

Atualmente o Brasil defronta-se com a perspectiva de um aumento significativo da demanda de etanol (Figura 2). Esta previsão sustenta-se em três realidades de mercado: aumento interno do consumo de álcool hidratado pelo sucesso da introdução da alternativa *flex fuel* no mercado de veículos automotivos leves (Figura 3); expansão das exportações brasileiras de etanol em função do crescente interesse mundial pela mistura do álcool a gasolina (Figura 4); opção

brasileira pela produção do biodiesel utilizando etanol na transesterificação dos óleos vegetais (BARCELOS, 2012).

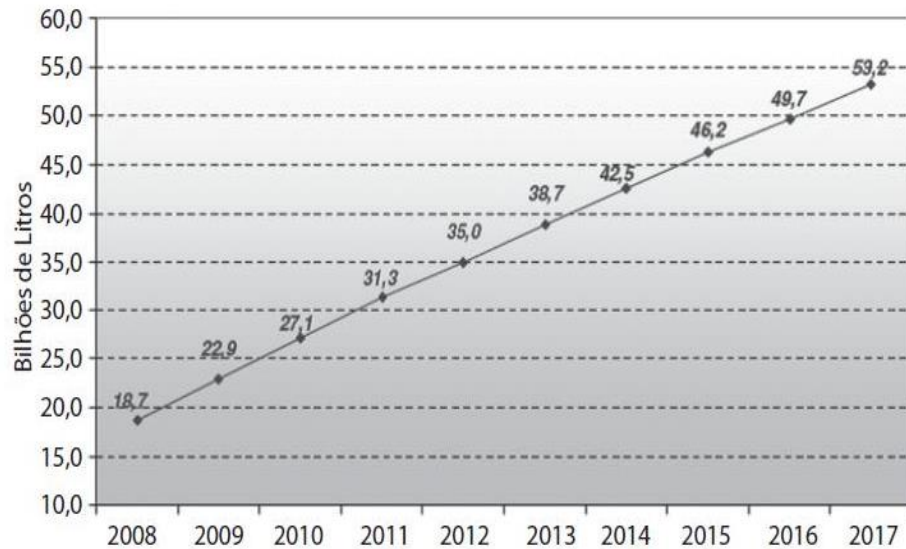


Figura 2 – Projeção de Consumo de álcool carburante no Brasil (2008-2017)

Fonte: Teixeira e Rodrigues, 2012 adaptado de BRASIL, 2008

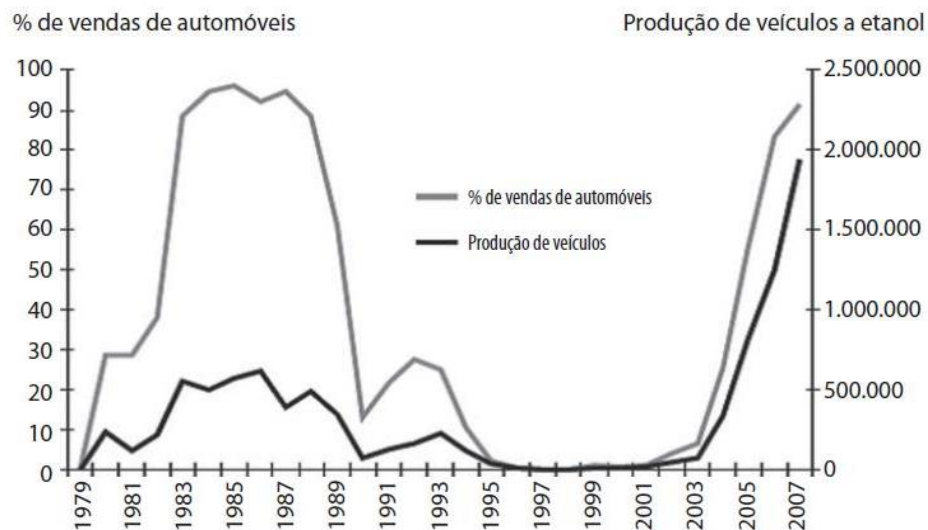


Figura 3 – Evolução da venda de veículos a etanol hidratado e sua participação na venda de carros novos

Fonte: Teixeira e Rodrigues, 2012 adaptado de ANFAVEA, 2008

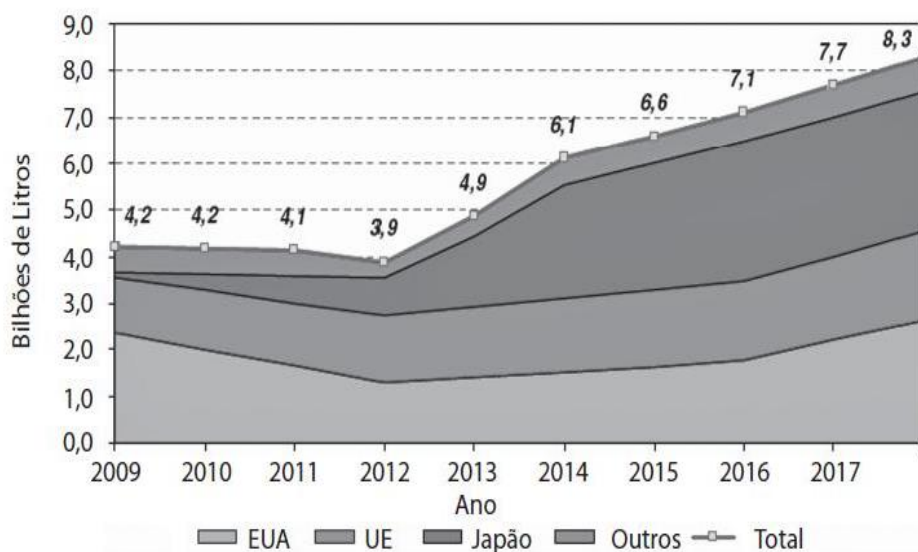


Figura 4 – Projeção total das exportações brasileiras de etanol

Fonte: Teixeira e Rodrigues, 2012 adaptado de BRASIL, 2008

Críticas têm sido levantadas sobre os rendimentos líquidos de energia e a diminuição de gases do efeito estufa dos processos convencionais de produção do etanol de milho. Já os processos de etanol de cana-de-açúcar são considerados de fato renováveis e sustentáveis, uma vez que o bagaço da cana é capaz de suprir toda a energia necessária para a fase industrial da produção do etanol, embora existam questões relacionadas às queimas praticadas no canavial durante a etapa de colheita (FARRELL *et al.*, 2006). Outro ponto controverso deve-se ao fato de a produção de "biocombustíveis de primeira geração" competir diretamente com a produção de alimentos ao utilizar matérias-primas nobres e de uso alimentar e, mesmo caso não desloque alimentos para uso energético, deslocam a produção de alimentos ao ocupar terras férteis, que poderiam ser utilizadas para o cultivo (BOMTEMPO, 2011).

No Brasil, a incorporação de novas áreas à agricultura de energia tem ocorrido sem competição com a agricultura de alimentos. Existe grande disponibilidade de terras com pastagens degradadas, nas quais a inserção da cana-de-açúcar é capaz de beneficiar também o pecuarista, que pode ter aumento na rentabilidade de sua propriedade rural e ainda melhorar a condição de fertilidade do solo (GOLDEMBERG; NIGRO; COELHO, 2008).

O estabelecimento de metas extremamente ambiciosas para aumento do consumo do etanol nos próximos anos, principalmente nos países desenvolvidos, requer um aumento substancial da produção de etanol e, nesse sentido, estimula a

pesquisa e o desenvolvimento de novas matérias-primas para o etanol, como a biomassa lignocelulósica, e a construção de biorrefinarias integradas, um conceito análogo ao das refinarias de petróleo (BASTOS, 2007).

3.1.4 Resíduos Agroindustriais: Fonte de Energia Economicamente e Ambientalmente Promissora

Segundo Cinelli (2012) a tendência mundial para a exploração de biomassas residuais é evidente. O aproveitamento de resíduos advindos da agroindústria através de novos processos biotecnológicos parece ser o caminho mais promissor para a utilização de uma matéria-prima ainda subutilizada, pois, além de resolver parte dos problemas ambientais na disposição dessas na natureza não tem possibilidades da concorrência entre elas e produção de alimentos, já que, se trata de rejeitos.

Os materiais lignocelulósicos vêm sendo estudados como fonte de açúcares fermentáveis para a produção de etanol, denominado de etanol de segunda geração, devido a sua grande disponibilidade e baixo custo (MARTÍN *et al.*, 2007), sendo que dentre estas fontes podem-se destacar os resíduos agroindustriais como casca e palha de arroz, palha de cevada, palha de trigo, sabugo e forragem de milho, e principalmente o bagaço e a palha de cana-de-açúcar (BARCELOS, 2012).

O uso desses insumos, que possuem baixo custo, pode ainda impactar economicamente positivo aos processos de produção de etanol. No caso dos Estados Unidos, por exemplo, os custos com o milho, principal matéria-prima, equivalem a cerca de 60% do total dos custos operacionais das plantas industriais (PIMENTEL; PATZEK, 2005. PERKIS *et al.*, 2008).

Muitos métodos tecnológicos de conversão dos produtos da biomassa lignocelulósica foram desenvolvidos e propostos como, por exemplo, tratamento biológico (com enzimas) e tratamento físico-químico (em água quente). O açúcar é esperado como produto e, aldeídos e ácidos orgânicos são obtidos colateralmente com a reação hidrotérmica (MOCHIDZUKI *et al.*, 2003).

Vários processos hidrolíticos são utilizados, sendo que a resistência do material lignocelulósico a estes tratamentos são um problema importante. Vários processos de hidrólise para raspas de madeira e resíduos lignocelulósicos usam baixa concentração de ácido para catálise e alta pressão e temperatura utilizando

autoclaves (PRIMO-YUFERA *et al.*, 1995). Todavia, segundo Cinelli (2012) existe processos sob a utilização de enzimas e altas temperaturas para hidrólise de materiais amiláceos, porém, por conta dos custos operacionais alguns deles tornam-se economicamente inviáveis para a produção de biocombustíveis.

Todas essas questões têm impulsionado a busca por inovações em processos e por diferentes matérias-primas. A busca pela matéria-prima ideal, ou pelas matérias-primas ideais, avança rapidamente sendo que os requisitos desejados para estas matérias-primas incluem múltiplos fatores, não facilmente conciliáveis, tais como: disponibilidade, preço, qualidade em relação ao processo de conversão e sustentabilidade ambiental (BOMTEMPO, 2011).

3.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

3.2.1 Aspectos Gerais

Lignocelulósicos são materiais fibrosos, que formam matrizes complexas constituídas principalmente de celulose, um rígido polímero de glicose, hemiceluloses, pectinas e outras gomas. Adicionalmente, essa matriz é envolvida com lignina, a qual pode ser considerada como uma cobertura de resina plástica responsáveis por criar uma barreira natural contra a ação de microrganismos e/ou enzimas, tornando esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos (Figura 5). Os materiais lignocelulósicos são encontrados na biomassa vegetal, termo usualmente empregado para designar matéria orgânica produzida, tanto pelas espécies vegetais, como por seus resíduos (CASTRO, 2009. FENGEL; WEGENER, 1989).

Os lignocelulósicos são renováveis, geralmente subutilizados e disponíveis abundantemente em várias matérias-primas. Esses materiais podem ser obtidos a custos relativamente baixos, de uma grande variedade de recursos, como resíduos agroflorestais e resíduos urbanos (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

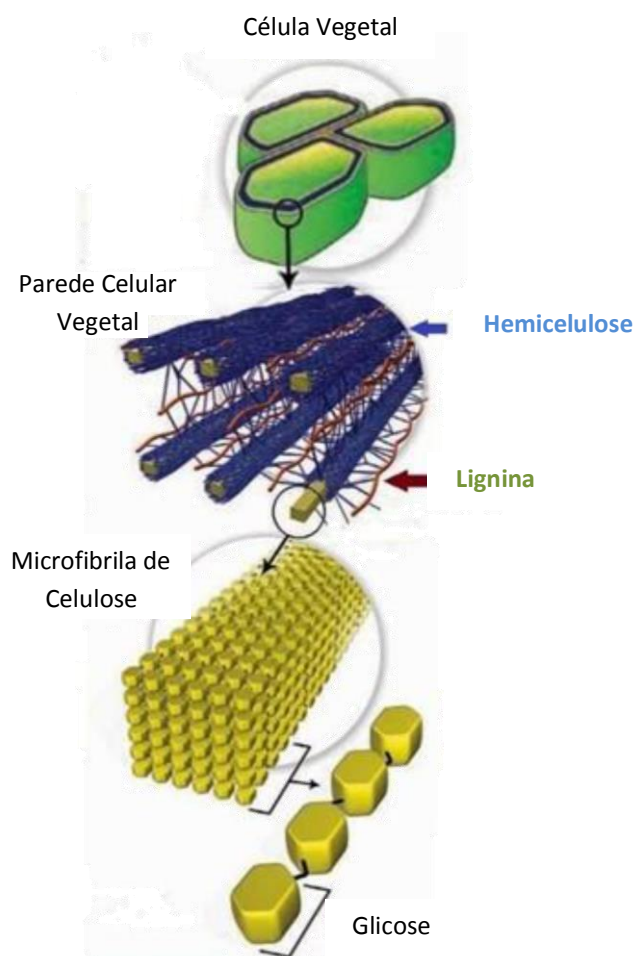


Figura 5 – Estrutura da parede celular dos vegetais
Fonte: Adaptado de Wolf, 2011

A proporção destes componentes varia na composição dependendo da espécie da planta, idade, tempo de colheita e condição ou estágio de crescimento (JEFFRIES; JIN, 2000). O maior componente é a celulose e é comum apresentar entre 35 e 50%, seguido de hemicelulose (20 – 35%) e lignina (10 – 25%) (Tabela 1) (SAHA, 2003). Cinzas, compostos fenólicos, ácidos graxos e outros constituintes, denominados extrativos, compõem a fração remanescente destas biomassas vegetais (OLIVEIRA, 2007).

Tabela 1 – Teor de constituintes em biomassas vegetais

Constituintes	Madeira dura Eucaliptus	Madeira mole Pinus	Bagaço de cana	Palha de milho
Celulose (%)	34 – 48	40 – 45	30 – 39	45
Hemicelulose (%)	20 – 25	10 – 13	24 – 30	35
Lignina (%)	20 – 29	26 – 34	18 – 22	15
Cinzas (%)	0,3 – 1,2	0,2 – 0,8	1 – 4	45

Fonte: Castro, 2009

3.2.1.1 Celulose

A Celulose é um polímero linear de glicose de alta massa molecular formado de ligações β - 1,4 glicosídicas, sendo a celobiose (que consiste em duas unidades de glicose) a unidade repetitiva do polímero (Figura 6). A celulose é o principal componente da parede celular da biomassa vegetal, quando separada dos outros constituintes do material lignocelulósico, apresenta uma grande reatividade governada pela sua estrutura química e física (BARCELOS, 2012; CASTRO, 2009).

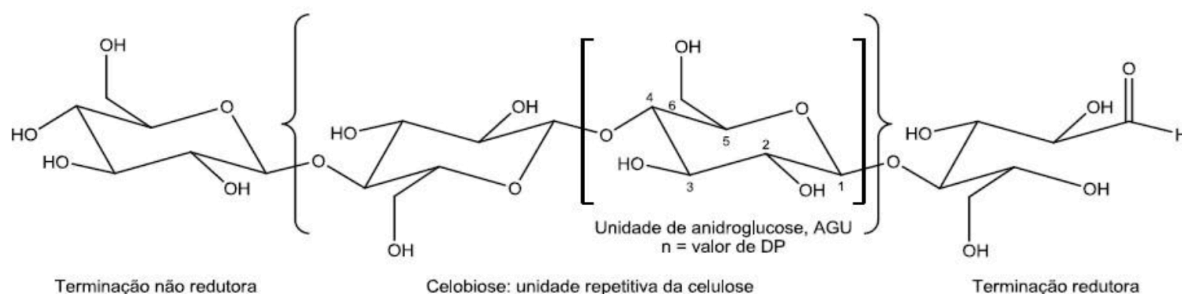


Figura 6 – Estrutura molecular da celulose

Fonte: Klemm *et al.*, 2005

Em uma molécula de celulose pode haver mais de 15.000 unidades de glicose e as cadeias de celulose se encontram agregadas paralelamente para formar as fibrilas elementares, que são insolúveis em água e apresentam regiões cristalinas e amorfas (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006; FENGEL; WEGENER, 1989)

Uma molécula de celulose pode ter áreas com configuração ordenada, rígida e inflexível em sua estrutura (celulose cristalina) e outras áreas de estruturas flexíveis (celulose amorfa) (Figura 7). Essas diferenças são responsáveis por algumas variações de comportamento físico, que podem ser observadas, em uma molécula de celulose. Por exemplo, absorção de água e inchamento de uma molécula de celulose é limitada as regiões amorfas da molécula. A forte rede de ligações de hidrogênio das regiões cristalinas impede a ocorrência do processo de inchamento nessas áreas (CASTRO, 2009).



Figura 7 – Representação esquemática da organização das cadeias de celulose
Fonte: adaptada de Gurgel, 2010

As ligações de hidrogênio inter e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e tornam a celulose altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (WOOD; SADDLER, 1988; CONVERSE; WARE, 1994).

3.2.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um grupo de polissacarídeos, constituído de vários tipos de unidades de açúcares que podem ser definidos como solúveis em álcali, estando localizado na parede celular da biomassa vegetal (Figura 8) (CASTRO, 2009). Estruturalmente, as hemiceluloses são moléculas planas, que auxiliam na formação de ligações cruzadas entre a celulose e a lignina (AHMAD *et al.*, 2007).

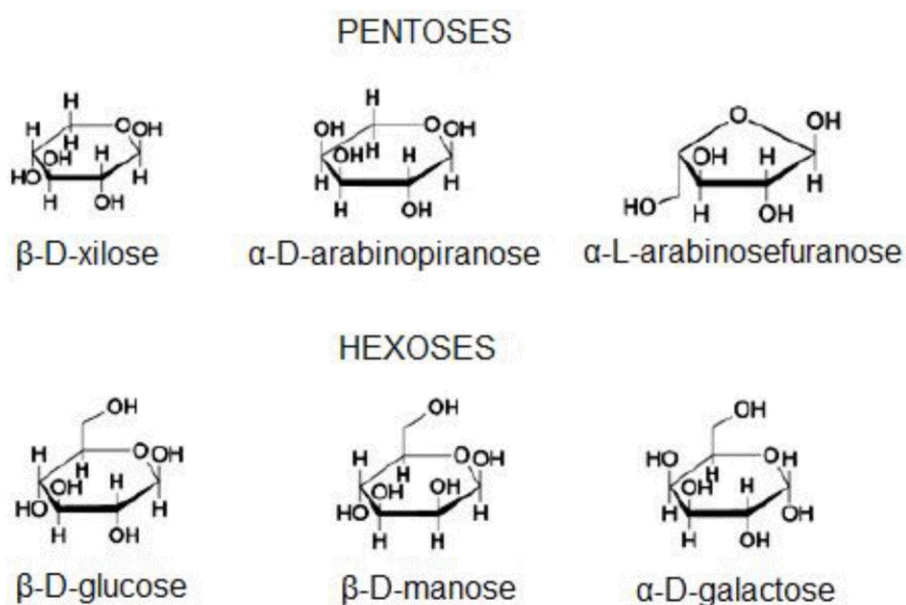


Figura 8 – Alguns componentes da fração hemicelulose
Fonte: adaptada de Moraes, Nascimento e Melo 2005

A hemicelulose por sua vez é um heteropolímero (heteropolissacarídeo) menor que a celulose, com grau de polimerização entre 100 e 200, muitas ramificações, isto é, ligado entre si de diferentes formas e contendo diferentes carboidratos como a xilose, arabinose, manose, galactose, glicose, assim como ácidos urônicos. Os mais abundantes são os xilanos, polissacarídeos compostos de uma cadeia ramificada de xilose (Figura 9). Dependendo da predominância do tipo de açúcar as hemiceluloses podem ser chamadas de arabino-xilanas, mananas, glucanas ou galactanas. Esses açúcares contêm cinco (pentoses) ou seis (hexoses) carbonos em sua estrutura e são unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,3, β -1,4 e β -1,6, quase sempre acetiladas, formando uma estrutura fraca e hidrofílica que serve como uma conexão entre a lignina e as fibras de celulose, além de conferir rigidez ao complexo celulose-hemicelulose-lignina (STAMBUK *et al.*, 2008; HATFIELD *et al.*, 2007).

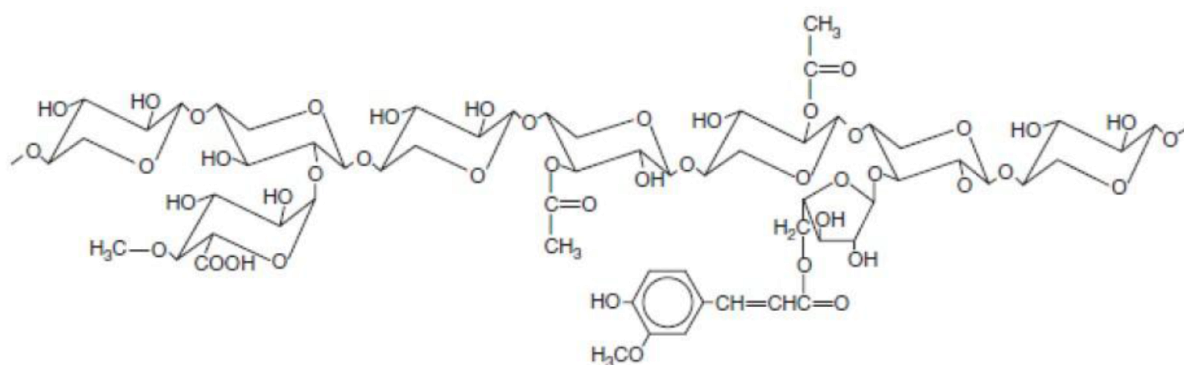


Figura 9 – Estrutura de xilana de plantas anuais e perenes

Fonte: Spiridon e Popa, 2008

A principal característica química da hemicelulose é que ela pode ser separada da celulose por meio de extração alcalina de material designificado (HATFIELD *et al.*, 2007). Comercialmente, a hemicelulose pode ser uma fonte de carboidratos para a formação de etanol (TAHERZADEH; KARIMI, 2007), espessantes, adesivos, coloides protetores, emulsificantes, estabilizantes, furfural e derivados (KAMM; KAMM, 2004).

As hemiceluloses diferem da celulose principalmente por sua constituição em diferentes unidades de açúcares formando cadeias moleculares curtas e bastante modificadas (Quadro 1) (BARCELOS, 2012).

Quadro 1 – Principais diferenças entre celulose e hemicelulose

Celulose	Hemicelulose
Unidades de glicose ligadas entre si	Unidades de açúcares variadas ligadas entre si
Grau de polimerização elevado	Grau de polimerização baixo
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Forma regiões amorfas e cristalina	Forma somente regiões amorfas
Atacada lentamente por ácido mineral diluído a quente	Atacada rapidamente por ácido mineral diluído a quente
Insolúvel em álcali	Solúvel em álcali

Fonte: Bianchi (1995)

Na fabricação de papel, a presença de certa quantidade de hemicelulose é importante, porém, estas são indesejáveis na fabricação de derivados de celulose. Devido à ausência de cristalinidade, sua baixa massa molecular e configuração irregular, as hemiceluloses absorvem água facilmente. Este fato contribui para: reduzir o tempo e energia requerida no refino da pasta celulósica e aumentar a área específica ou de ligação das fibras (CASTRO, 2009).

3.2.1.3 Lignina

“A lignina é a substância aromática mais abundante na biosfera, e um dos maiores constituintes dos vegetais (LI; YUAN; YANG, 2009)”. É considerada como um dos materiais mais resistentes na natureza. Na biomassa vegetal, a lignina está associada juntamente com a celulose e hemicelulose através de interações físicas e ligações covalentes, o que impede a degradação desses materiais, isto é, a lignina confere firmeza e rigidez ao conjunto de fibras de celulose. Ela está presente na parede celular, conferindo suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra ataques microbianos e estresse oxidativo. Portanto, não deve ser considerada como uma substância química única, mas sim, como uma classe de materiais correlatos (CASTRO, 2009; READING; WELCH; AUST, 2003; PÉREZ *et al.*, 2002; HOFRICHTER, 2002; FENGEL; WEGENER, 1989).

A lignina é um polifenol construído de unidades de fenil-propanas (C6-C3). Diferente da celulose, a lignina não tem estrutura cristalina e é considerado um polímero amorfo, cuja estrutura principal, provém da polimerização desidrogenativa

(iniciada por enzimas) dos seguintes precursores primários: álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 10) (CASTRO, 2009).

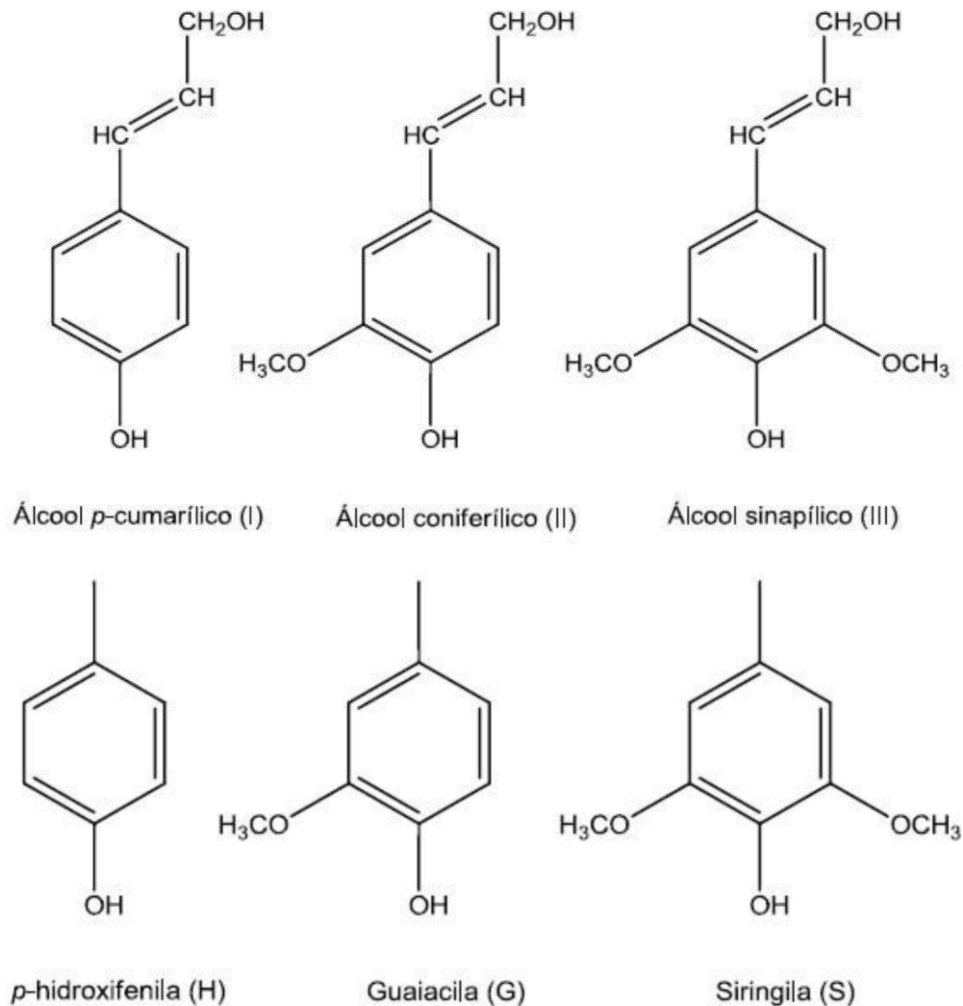


Figura 10 – Unidades precursoras da lignina: alcoóis cumarílico (I), coniferílico (II) e sinapílico (III) e principais núcleos aromáticos encontrados na lignina: *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S)

Fonte: Fengel e Wegener, 1989

Esta macromolécula é formada de uma complexa estrutura de polímeros amorfos e possui característica hidrofóbica. Além disso, ela auxilia no transporte de água na planta e no sequestro de carbono (Figura 11) (BARCELOS, 2012).

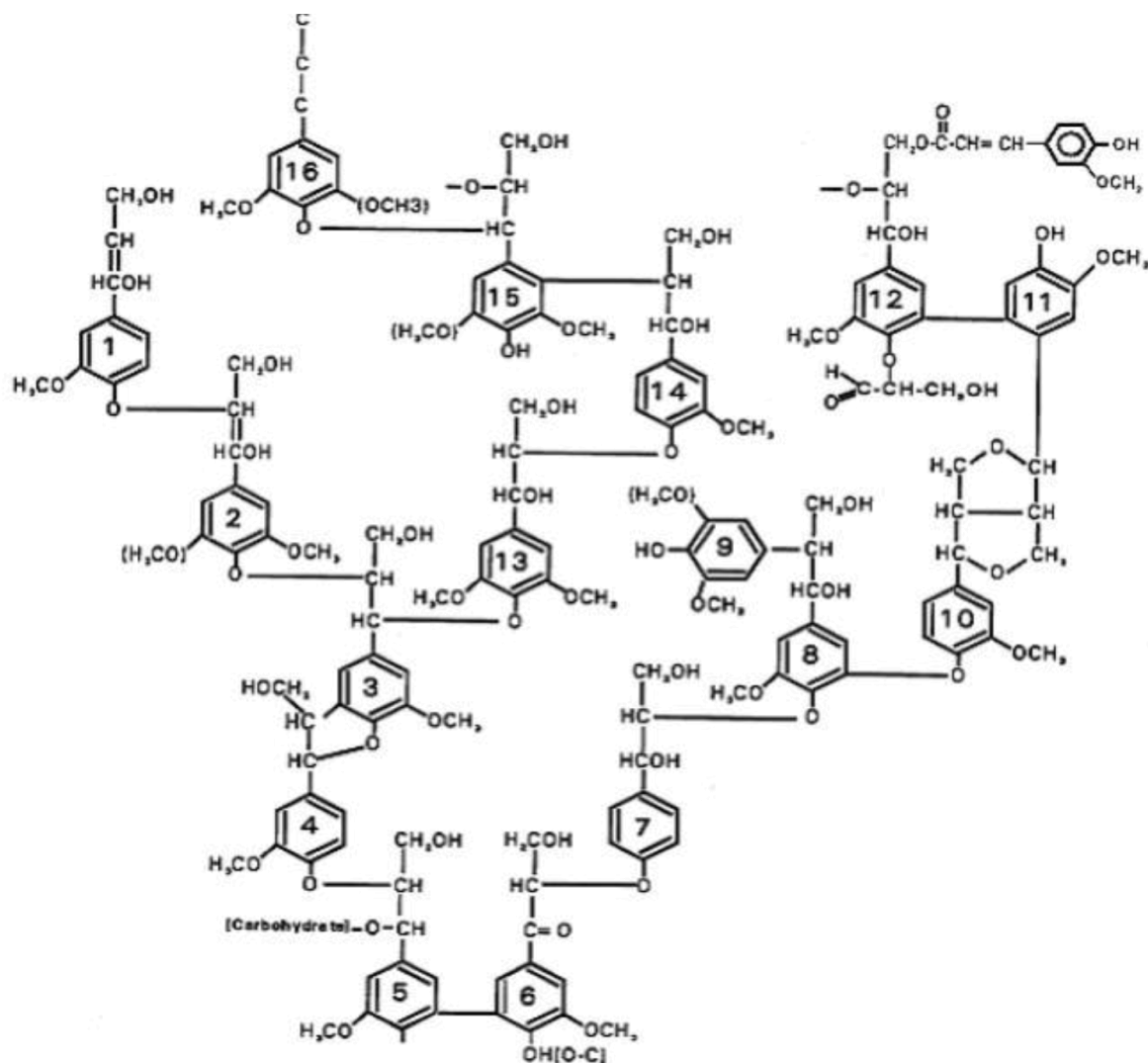


Figura 11 – Estrutura da lignina
 Fonte: Fengel e Wegener, 1989

3.2.1.4 Outros Compostos

Os materiais lignocelulósicos podem conter também uma extensa variedade de extrativos orgânicos, os quais podem ser extraídos por solventes polares ou apolares. São exemplos de extrativos: ácidos graxos, ceras, alcaloides, proteínas, fenólicos, açúcares simples, pectinas, mucilagens, gomas, resinas, terpenos, amido, glicosídeos, saponinas e óleos essenciais (BARCELOS, 2012).

Os extrativos podem variar quantitativa ou qualitativamente, oscilando, em materiais provenientes de madeiras, de 2% a 5%, podendo alcançar níveis de 15% em algumas espécies tropicais (MIYAUCHI; MORI; ITO, 2005; ZHANG *et al.*, 2007). Segundo Foekel e Kleine (2012) o teor de extrativos total do bambu, por exemplo, pode chegar a aproximadamente a 21%.

A biomassa vegetal também contém uma pequena quantidade de espécies inorgânicas, tais como, potássio, sódio, cálcio, etc., como resultado dos nutrientes adquiridos durante o seu crescimento (YU; LOU; WU, 2008).

Os extrativos são compostos intermediários do metabolismo do vegetal; proporcionam reserva energética e proteção ao vegetal contra o ataque de microrganismos e insetos, porém têm um efeito inibitório nos processos de conversão de biomassa (FENGEL; WEGENER, 1989), sendo um “gargalo” na indústria processadora dessa biomassa (OCTAVE; THOMAS, 2009).

Por exemplo, no processo de extração de celulose, principalmente para a produção de papel, os extrativos podem gerar uma série de problemas, acumulando-se no maquinário, em depósitos denominados de *pitch* (SILVÉRIO *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007). Além disso, se lançados no meio ambiente, podem causar problemas hormonais e hematológicos⁴ em peixes e em crustáceos, mesmo em baixas concentrações (CHRISTIANSON-HEISKA *et al.*, 2008; KAMAYA; TOKITA; SUZUKI, 2005; LEIVISKÄ; RÄMÖ, 2008).

3.3 O BAMBU



Figura 12 – Bambuzal nativo na cidade de Salvador - BA

Fonte: Schuler, 2016

⁴ Relativo aos componentes do sangue (hemácias, leucócitos e plaquetas) e alguns órgãos (baço, medula óssea e linfonodos).

3.3.1 Generalidades

Os bambus pertencem à família das *Poaceae* (gramíneas) e a subfamília *Bambusoideae* que por sua vez se divide em duas grandes tribos: bambus herbáceos e os bambus lenhosos (Quadro 2) cujas algumas diferenças entre eles foram descritas por Filgueiras e Gonçalves (2004). Segundo Oliveira *et al.* (2008) são da família da cana-de-açúcar, trigo, milho, sorgo, dentre outros.

Quadro 2 – Principais diferenças entre os bambus herbáceos e lenhosos

Característica	Herbáceos	Lenhosos
Comprimento	Geralmente, 2 metros	1 – 35 m
Consistência do Colmo	Não lignificado (sem resistência mecânica)	Lignificado (com resistência mecânica)
Folha do Colmo	Ausente	Presente
Florescimento	Contínuo (Policárpico)	Sazonal (Monocárpico)
Exposição direta ao sol	Intolerante	Tolerante

Fonte: adaptado de Filgueiras e Gonçalves, 2004

É um vegetal com mais de 200 milhões de anos e 1.300 espécies (40% lenhosos), das quais 50 domesticadas e 38 estudadas. Do total de florestas do planeta, o bambu responde por 3% (SANTI, 2015).

Embora seja uma gramínea, os bambus possuem hábito arborescente e da mesma forma que as árvores apresentam uma parte aérea constituída pelo colmo, folhas e ramificações e outra subterrânea composta pelo rizoma e raiz (Figura 13) (SILVA, 2005). Possuem uma estrutura vegetativa muito simples que consiste de um sistema que pode ser diferenciado como rizomas, colmos consistindo uma série de nós, entrenós e ramos laterais. Os rizomas e colmos tem uma vida útil limitada comparativamente com a idade da planta de bambu, pois esses são constantemente substituídos por novos (LYBEER, 2006 *apud* MOREIRA 2012).

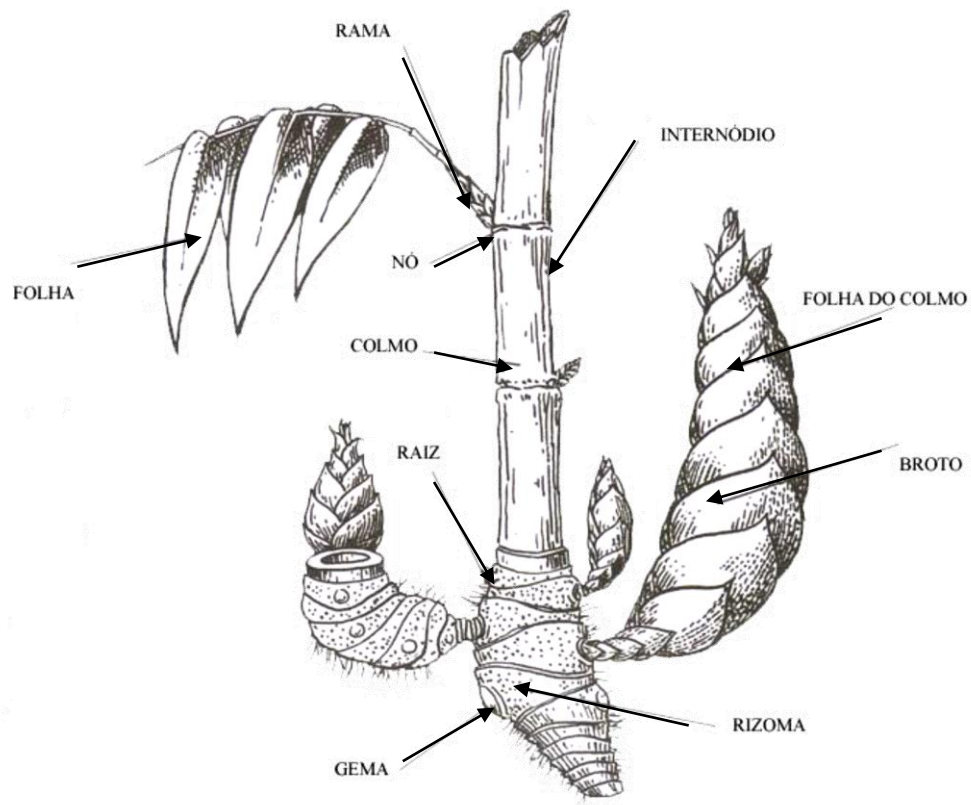


Figura 13 – Partes do bambu

Fonte: NMBA, 2004

Basicamente existem dois grupos distintos de bambus quanto ao tipo de rizoma: os que formam touceiras (simpodiais) e os alastrantes (monopodiais) (Figura 14) (SILVA, 2005).

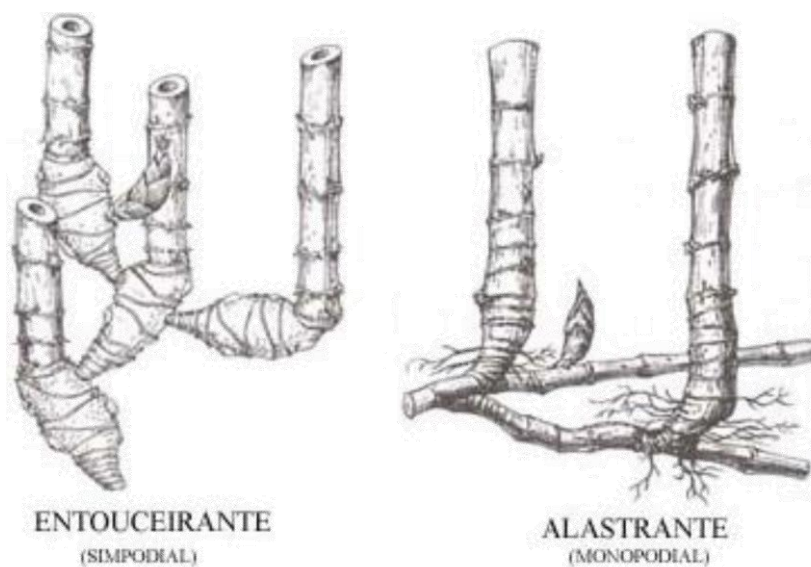


Figura 14 – Diferentes tipos de rizomas

Fonte: NMBA, 2004

Os alastrantes são leptomorfos (monopodial), resistentes ao frio, possui comportamento invasor e tem origem na China, tendo o gênero *Phyllostachys* como um dos seus principais representantes. Os entouceirantes são paquimorfos (simpodial), tendo como principais representantes exóticos no Brasil os gêneros *Bambusa* e *Dendrocalamus*. A grande maioria destes bambus se desenvolve melhor em climas tropicais, apresentando um crescimento mais lento em temperaturas baixas (SILVA, 2005).

O colmo (Figura 15) tem origem na gema e não apresentam crescimento radial, ou seja, eles já nascem com seu diâmetro máximo de base e cresce se afunilando, ficando com um aspecto cônico. Os mesmos são segmentados por nós que possuem uma fina parede interna chamada de diafragma. Os espaços existentes entre dois nós são chamados de entrenós e são geralmente ocos (Figura 16) (SILVA, 2005).



Figura 15 – Colmos de bambu

Fonte: <http://www.lifeandstyle.com.br/wp-content/uploads/2013/05/th-2.jpeg>

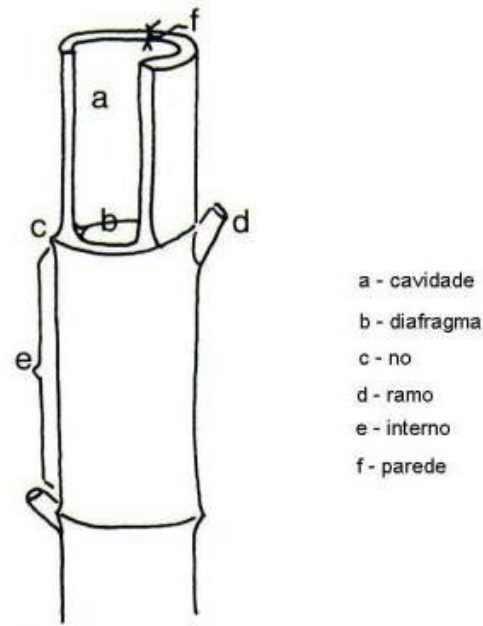


Figura 16 – Partes do colmo do bambu
Fonte: <http://wwwp.feb.unesp.br/pereira/bambu.htm>

Segundo Moreira (2012) e Silva (2005) os colmos são capazes de realizar fotossíntese, assim como as folhas. Porém, suas principais funções são de estruturar a parte aérea, armazenar e conduzir a seiva bruta e elaborada. Para que isso aconteça, o colmo possui células que se alinham no sentido axial e são protegidas por feixes de fibras promovendo a sua rigidez, uma fração dessas células é denominada parênquimas, nelas está depositada uma fonte de reserva energética da planta em forma de polímeros de amido (Figura 17).

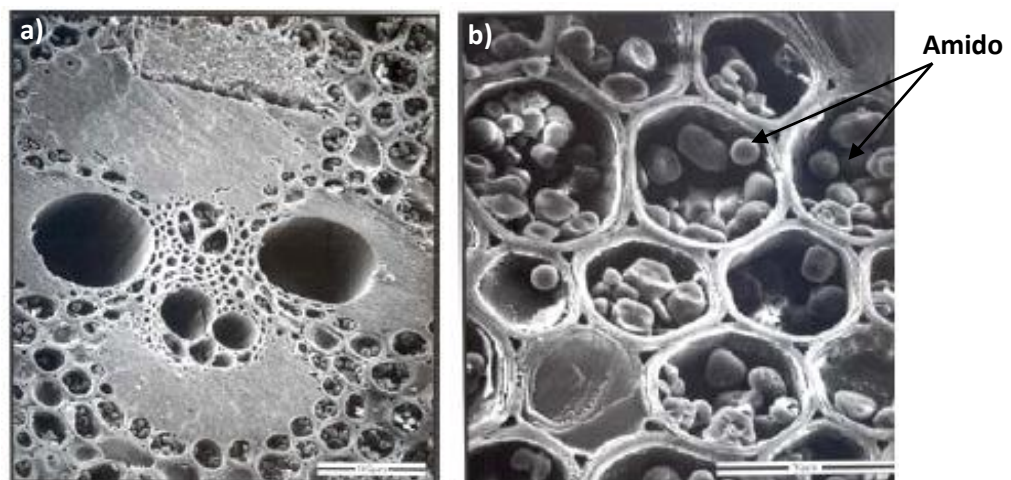


Figura 17 – Corte transversal do colmo:
 (a) feixes vasculares e células parenquimáticas e
 (b) parênquimas dos colmos com grãos de amido
Fonte: Liese (1998)

3.3.2 Aspectos Agroeconômicos

O bambu é um recurso natural abundante na Ásia e em outras regiões do mundo, podendo ser renovado mais rapidamente do que a madeira, uma vez que o tempo necessário para alcançar seu tamanho adulto é apenas de seis a oito meses, menos de 5% do tempo necessário para a maioria das madeiras (MI; CHEN; GUO, 1997). Azzini, Ciaramello e Salgado (1981) *apud* Silva (2005) avaliando a velocidade de crescimento dos colmos de algumas espécies de bambus em Campinas, São Paulo, encontraram o valor máximo de 22 cm em 24 horas para o *Dendrocalamus giganteus* e Ghavami (1995) observou, no Rio de Janeiro-RJ, para a mesma espécie um incremento diário de 39 cm. Devido sua velocidade de crescimento, pode ser considerado maduro para sua utilização entre 2 e 6 anos, diferente da maioria das madeiras, que demoram aproximadamente 20 anos para alcançar seu amadurecimento (LOPEZ; CORREAL, 2009 *apud* GUIMARÃES JUNIOR; NOVACK; BOTARO, 2010). Santi (2015) cita que o bambu tem a capacidade de suportar 100 cortes, sendo um a cada dois anos, sem necessidade de replantio, é um excelente sequestrador de carbono, tem pouca emissão de dióxido de carbono e oferece um bom rendimento em matéria seca por hectare (em volta de 30% de umidade em período chuvoso e 15 – 20% em período seco)

Aproximadamente 320 espécies em 22 gêneros, encontram-se no continente americano, sendo o Brasil o país com a maior diversidade, reunindo 81% destes gêneros lenhosos. As espécies exóticas mais comuns no Brasil são: *Bambusa vulgaris*, *Bambusa vulgaris* var. *vittata*, *Bambusa tuldoidea*, *Dendrocalamus giganteus*, todas estas de origem asiática trazidas pelos colonizadores portugueses e posteriormente pelos orientais (SANTI, 2015; SILVA, 2005).

Os bambus ocorrem naturalmente em todos os continentes, exceto na Europa, sendo uma matéria-prima muito consumida nos países da Ásia. No Brasil a espécie introduzida mais explorada comercialmente é o *Bambusa vulgaris*, sendo o nordeste do Brasil o principal consumidor desta espécie, onde a área ocupada está em aproximadamente em 50.000ha para a produção de celulose de fibra longa. Estima-se que em todo o Brasil sejam produzidas anualmente por volta de 150 mil toneladas de celulose de bambu. Grande parte desse volume é fabricado pela CEPASA, do Grupo João Santos, na produção de sacos de papel para cimento de outra empresa do próprio Grupo. O bambu confere a resistência necessária a esses

sacos, fabricados a partir do mix entre fibras secundárias (aparas) e de bambu (SANTI, 2015; SALGADO *et al.*, 1992).

O fator solo no cultivo do bambu é um assunto pouco estudado no Brasil. As experiências mais significativas estão no Nordeste, nas grandes áreas de *Bambusa vulgaris* destinados a produção de celulose. Considerando a grande diversidade de solos existentes no Brasil, tais estudos seriam de grande importância para os cultivos comerciais desta planta (SILVA, 2005).

Em comparação ao amplo espaço conquistado pelo eucalipto e pelo pinus no Brasil, as perspectivas de uso de bambu na produção de celulose e papel continuam não sendo muito promissoras no curto prazo, em razão de diversos desafios. Ainda assim, vale destacar que nos segmentos de construção civil, biorrefinaria, energia renovável, madeireiro e de bionanotecnologia, por exemplo, a história do bambu vem escrevendo novos e interessantes capítulos (SANTI, 2015). Segundo Beraldo e Azzini (2004), o bambu no Brasil é subutilizado por conta da falta de conhecimentos específicos científicos, tecnológicos e agrônômicos da gramínea.

No processamento convencional, na forma de cavacos, o bambu, em comparação com as madeiras de eucalipto e pinus, fornece menor rendimento de conversão em fibras celulósicas. Esse rendimento, 10-15% inferior àqueles obtidos com as espécies arbóreas, está intimamente relacionado com o elevado teor de amido existente nos cavacos de bambu, que, além de contribuir para reduzir o rendimento em fibras celulósicas, eleva o consumo de reagentes químicos durante o processo de deslignificação dos cavacos (Tabela 2) (AZZINI *et al.*, 1987b). Segundo SANTI (2015), o bambu quando utilizado para fabricação de celulose requer mudança nos picadores por conta do excesso de amido, além dos pontos levantados por Azzini *et al.* (1987b) tornando-o menos interessante aos fabricantes.

O bambu é submetido ao corte raso e picado na floresta por meio de picadores móveis. Já na fábrica é peneirada e a fração não adequada à produção do papel é destinada à geração de energia. O papel produzido além de atender os padrões de exigência do mercado não apresenta nenhum resíduo de enxofre. O processo de produção de pasta celulósica de bambu tende a ser mais viável quando associado à produção do álcool a partir da sacarificação do amido presente nos seus parênquimas. O amido contido nos cavacos reduz a conversão em celulose ou fibras celulósicas e eleva o consumo de reagentes demandados no processo de deslignificação (AZZINI; GONDIM-TOMAZ, 1996).

Tabela 2 – Teor de constituintes em biomassa de bambu

Constituinte	Teor Médio (%)
Celulose	40 – 50
Hemicelulose	20 – 25
Pentosanas	15 – 20
Lignina Insolúvel em ácido	17 – 24
Lignina Solúvel	1 – 1,5
Cinzas	1 – 2
Sílica	0,5 – 1,5
Extrativos em etanol/tolueno	3 – 5
Extrativos em diclorometano	0,3 – 0,9
Extrativos em água quente	7 – 15

Fonte: Foelkel e Klein (2012)

O ano de 2011 pode ser citado como um marco na linha do tempo do bambu no País, pois a criação da Lei n.º 12.484/2011, que dispõe sobre a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu (PNMCB), motivou produtores rurais a destinar terras ao cultivo desse vegetal usado em larga escala há tanto tempo na China e na Índia, inclusive para a produção de celulose e papel (SANTI, 2015). Segundo Moreira (2012) a lei tem por objetivo o desenvolvimento da cultura do vegetal no Brasil por iniciativa governamental ou privada, entretanto, ainda não está clara quanto ao seu uso como fonte de geração de energia, porém o posiciona como uma cultura importante para o desenvolvimento econômico e social do país.

Diante desse novo panorama nacional fica evidente a necessidade de novas pesquisas para o aproveitamento integral do bambu. O conceito de biorrefinaria demonstra no momento a mais evidente solução para tornar sua cultura economicamente mais viável tanto para fabricação de papel e celulose, quanto a produtos e subprodutos oriundos do amido.

3.3.3 Biorrefinarias: Uma Nova Perspectiva para o Bambu

O conceito essencial de uma biorrefinaria é o de um processamento sustentável em uma planta industrial que integra os processos de conversão de

biomassa para produzir combustíveis, produtos químicos de valor agregado e energia (REE; ANNEVELINK, 2007).

Nos panoramas que se abrem, dois aspectos centrais devem ser considerados: por um lado, o desenvolvimento de novas tecnologias de produção com base na biomassa e, por outro, o desenvolvimento de biorrefinarias. Esses desenvolvimentos representam a chave para uma produção integrada de alimentos, substâncias químicas, diferentes materiais e combustíveis para o futuro, pois combinam biotecnologia e conversões químicas de substâncias para processamento de biomassa em produtos intermediários e finais. Este desenvolvimento é absolutamente necessário para que se utilize de forma otimizada o menor volume de biomassa, disponível de forma geograficamente dispersada, com maior eficiência e o menor impacto ambiental possível (BARCELOS, 2012).

As pesquisas e desenvolvimento de tecnologias em biorrefinarias são necessárias para aumentar a compreensão científica acerca dos recursos provenientes da biomassa, além de melhorar a utilização desses recursos, otimizar a eficiência e desempenho em conversão de sistemas sustentáveis para o desenvolvimento de produtos a partir de biomassas renováveis, criar um ambiente de mercado receptivo ao emprego desses produtos, além da oportunidade de estimular o desenvolvimento econômico de áreas rurais com grandes potenciais de produção de biomassas (BARCELOS, 2012).

Neste sentido, Azzini *et al.*(1987a) *apud* Silva (2005) concluíram ser tecnicamente possível a produção conjunta de etanol e fibras celulósicas a partir do bambu (Figura 18). Os rendimentos em fibras celulósicas (46,85 a 56,04%) e etanol (12,77 a 14,79 litros/100 kg de cavacos) foram mais elevados nas regiões mediana e ponta dos colmos mais velhos. O rendimento em fibras brutas ou fração fibrosa (69,35 a 76,35%) foi mais elevado nos cavacos provenientes dos colmos mais novos. Para a extração do amido é necessário o rompimento das células parenquimáticas através de um processo mecânico e químico. Em seguida o amido é separado por arraste em água. Os efeitos da concentração de ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, tempo de tratamento, tempo de desfibramento e idade dos colmos na extração do amido de bambu foram estudados por Azzini e Arruda (1986) e Azzini e Gondim-Tomaz (1996).

Atualmente muitos pesquisadores estão concentrando esforços no desenvolvimento de pré-tratamentos eficientes, capazes de disponibilizar a maior

quantidade de açúcar possível (pentoses e hexoses), no desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados que possam fermentar tanto pentoses quanto hexoses, na produção de plantas geneticamente modificadas com maior quantidade de carboidratos ou plantas modificadas estruturalmente para facilitar a etapa de pré-tratamento em condições amenas e na utilização de processos integrados para reduzir o número de etapas do processo e consequentemente reduzir a demanda energética (DIEN *et al.*, 2003; JEFFRIES, 2006; HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006).

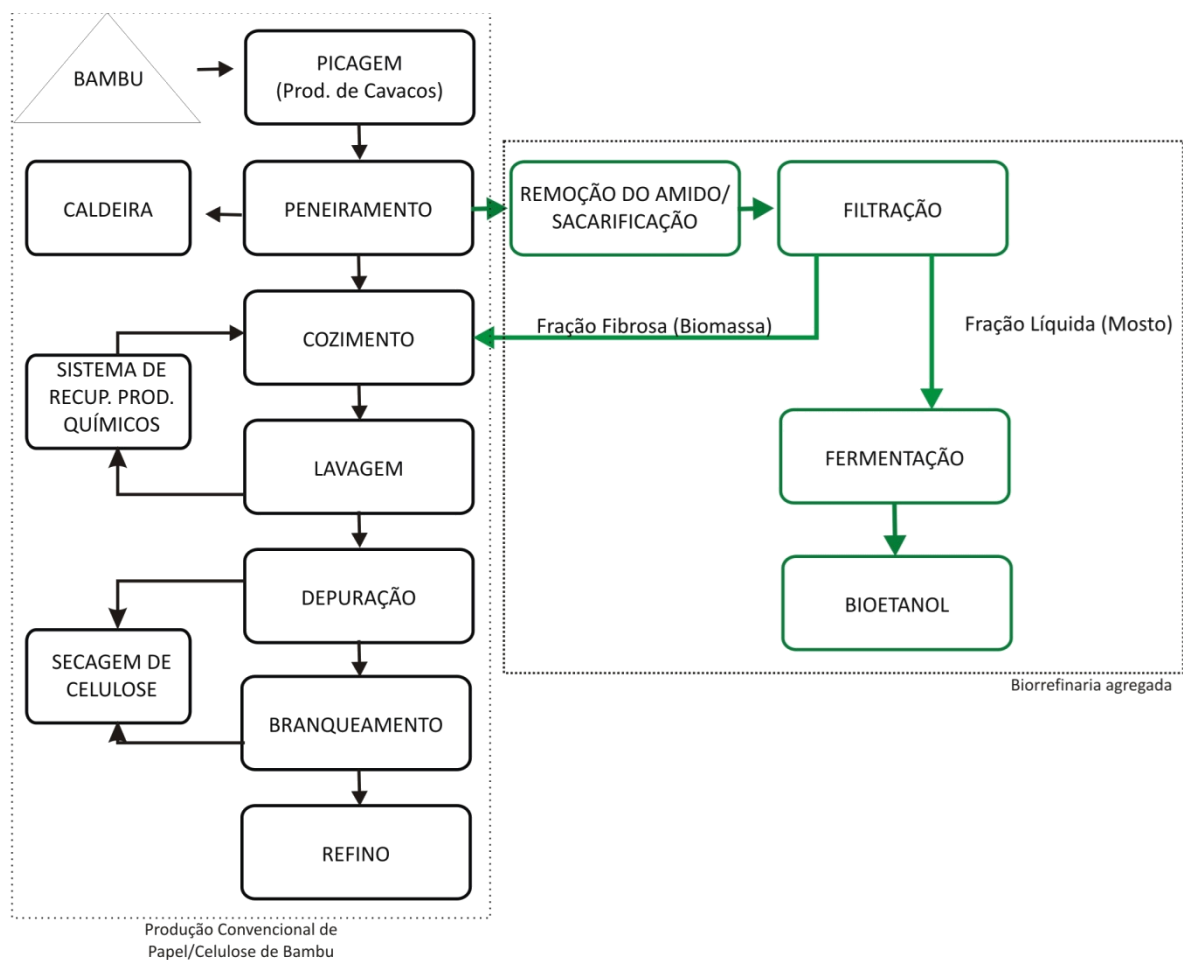


Figura 18 – Fluxograma proposto de uma biorrefinaria conjunta a produção de celulose de bambu

Fonte: adaptado de Piotto, 2003

3.4 PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE BAMBU

3.4.1 Amido

O amido está disponível em abundância na natureza; o único outro componente orgânico que ocorre naturalmente em quantidade maior é a celulose. É encontrado em todas as formas de vegetais de folhas verdes, seja nas suas raízes, caules, sementes ou frutas. O amido serve à planta como alimento, proporcionando-lhe energia em épocas de dormência e germinação, tendo papel semelhante no ser humano, nos animais e, até mesmo, em outros organismos e formas de vida. O homem utiliza o amido de muitas outras formas, além de sua finalidade inicial de fonte de energia biológica. Praticamente todos os setores industriais utilizam o amido ou seus derivados (FANI, 2013).

O amido fornece de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem (CEREDA, 2001). Trata-se de um substrato renovável, biodegradável e não tóxico (VAN DER BURGT *et al.*, 2000). É amplamente utilizado nas indústrias alimentícias, têxtil, na elaboração de compostos farmacêuticos, na produção de resinas naturais e na produção de materiais termoplásticos biodegradáveis. Pode também ser empregado na produção de alcoóis finos para preparo de bebidas e produção de álcool carburante. A exploração deste potencial depende do conhecimento de suas propriedades quanto à estrutura, forma, cor, absorção de água, solubilidade, inchamento e viscosidade (CEREDA, 2001).

É um polissacarídeo constituído por unidades D-glicose, sendo a principal reserva glicídica dos produtos alimentícios de origem vegetal. O amido, sob o ponto de vista químico, não é um produto puro, já que é constituído de 2 componentes moleculares de estruturas químicas semelhantes mas não idênticas: a amilose - cujos resíduos de glicose são unidos por ligações α -1,4, formando um polímero de cadeia linear e helicoidal; a amilopectina - polímero de estrutura molecular complexa, isto é, com ramificações, cujas unidades glicosídicas encontram-se unidas por ligações α -1,4 e α -1,6 (Figura 19) (PEDRENHO *et al.*, 2008; SAITO, 2005).

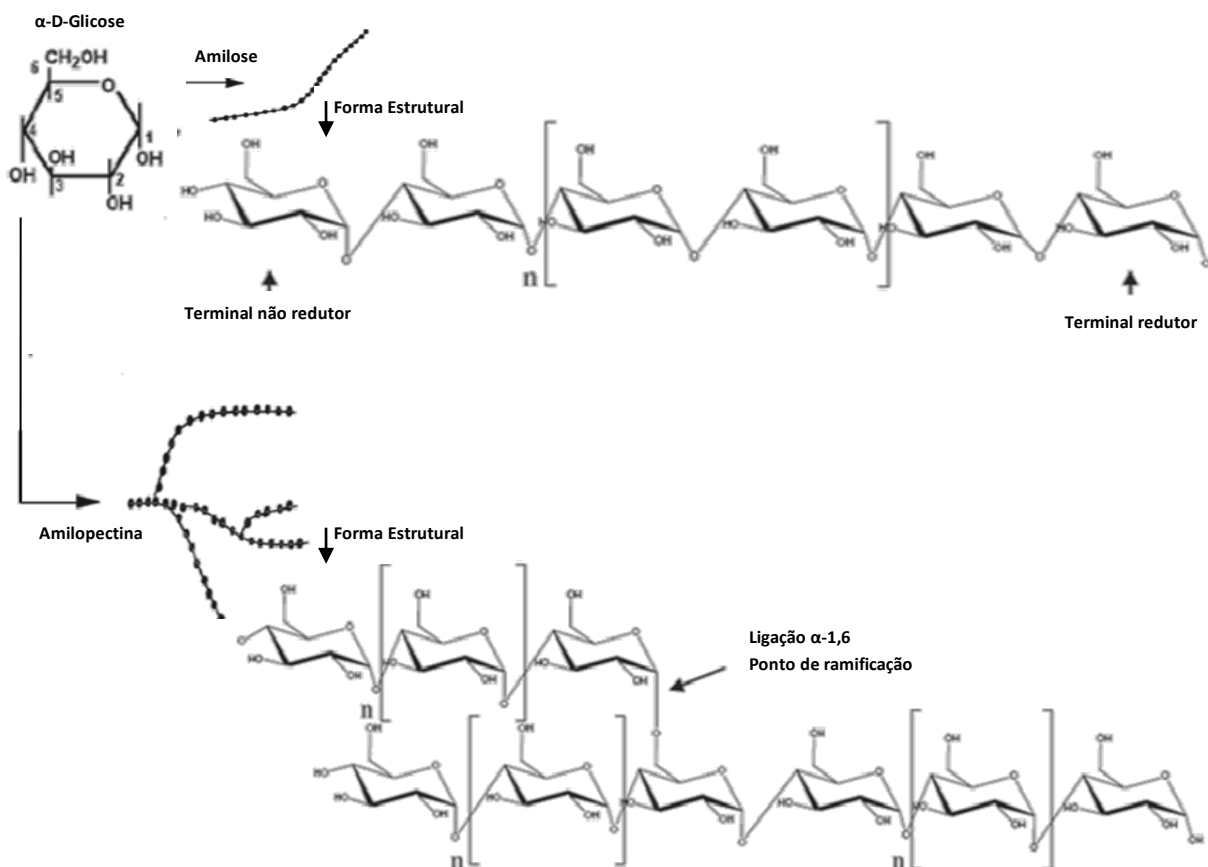


Figura 19 – Estrutura dos componentes do amido
Fonte: Cinelli, 2012 adaptado de Murphy, 2000 e Castro *et al.*, 2011

Devido ao seu alto peso molecular, o amido é passível de complexação com outros íons, formando compostos coloridos. No caso do amido essa reação acontece com iodo, que, enquanto solução, reage com a amilose e amilopectina formando complexos na cor azul intensa e vermelho-violáceo, respectivamente. Essa distinção de cores ocorre devido a conformação espacial da amilose em relação a amilopectina, por conta dessa conformação helicoidal (Figura 20) o iodo é retido de forma mais coesa pelo fenômeno da oclusão nas cadeias lineares da amilose (FCFAR, 2016).

A amilose tem uma faixa de massa molar média de aproximadamente 10^5 - 10^6 g/mol e pode conter cerca de 2-11 cadeias com entre 200 e 700 resíduos de glicose por cadeia, correspondendo a um grau de polimerização de 1.000 a 10.000 (TESTER; KARKALAS, 2001). No que diz respeito à amilopectina, esta é um polímero muito maior, com massa molar na faixa de 10^7 - 10^9 g/mol e um grau de polimerização que pode ser superior a 1.000.000. A maioria dos amidos contém 60 - 90% de amilopectina em massa (COPELAND *et al.*, 2009).

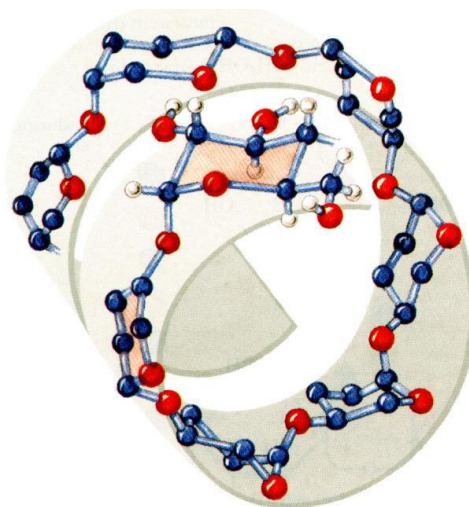


Figura 20 – Conformação espacial helicoidal da amilose

Fonte: http://ftp.unb.br/pub/UNB/cbsp/Download/Imagens/300_dpis/Biomoleculas-300/carboidratos/amido-estrutura_helicoidal.JPG

Apresenta-se na forma de grânulos com formato e tamanho dependentes da sua fonte botânica, as formas dos grânulos variam desde 0,5 até 175 μm . Os grânulos de amido de arroz estão entre os menores, variando de 3 a 5 μm de diâmetro, enquanto os de amido de batata (10-110 μm) estão entre os maiores (Figura 21). Os grânulos de amido de milho variam entre 5 e 26 μm com um diâmetro médio de 15 μm (SINGH *et al.*, 2003). Segundo Azzini (1983) o amido de bambu possui grânulos com tamanho médio de 5,55 μm , muito semelhante ao amido de arroz, portanto, possivelmente deve apresentar propriedades tecnológicas semelhantes.

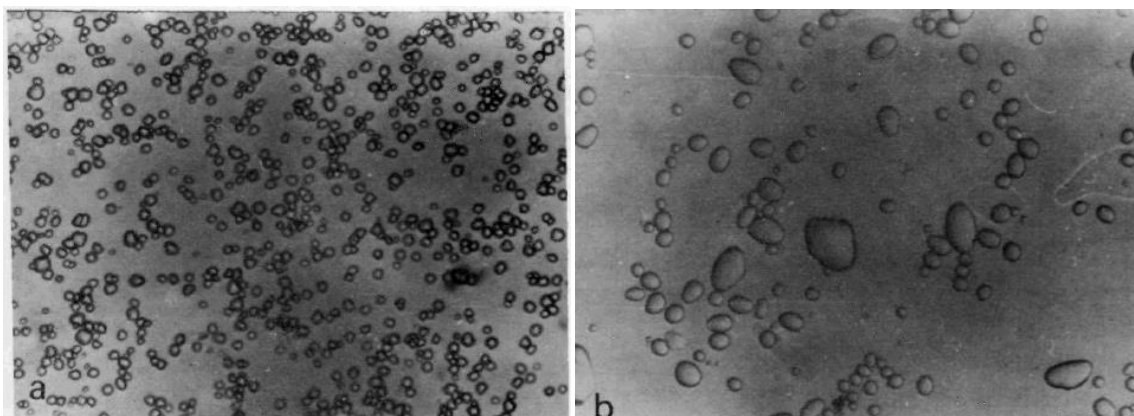


Figura 21 – Fotomicrografia com aumento de 200 vezes de grânulos de amido:
a) de bambu e b) de batata

Fonte: Azzini *et al.*, 1981

O amido gelatinizado é largamente empregado como agente espessante, como adesivo ou como encorpante de tecidos e papéis (PEDRENHO *et al.*, 2008). A gelatinização consiste no colapso (rompimento) da ordem das moléculas dentro dos grânulos de amido com mudanças irreversíveis nas propriedades, como o aumento dos grânulos, fusão de cristais, perda da ordem cristalina, aumento da viscosidade (SINGH *et al.*, 2003; BENINCA, 2008). Na temperatura de gelatinização as ligações de hidrogênio entre as cadeias de amilose e amilopectina tornam-se mais fracas e são rompidas, promovendo redução da cristalinidade, o que possibilita a entrada de água e inchaço dos grânulos (HOOVER, 2001). Essas temperaturas de gelatinização variam entre os amidos de diferentes fontes (CINELLI, 2012).

Singh *et al.* (2003), Almeida *et al.* (2011) e Shariffa *et al.* (2009) encontraram uma faixa de gelatinização entre 56 - 79°C para o amido de diferentes matrizes. Pedrenho *et al.* (2008) citam que na indústria o intervalo entre 80 a 85°C é o mais utilizado para esse fim. Estas diferenças de temperaturas entre os diferentes amidos podem ser atribuídas a diferenças no grau de cristalinidade (CINELLI, 2012).

Segundo Pedrenho *et al.* (2008) temperaturas acima de 100°C ou até de 120 a 130°C sob pressão por 2 duas horas tem a capacidade de desenovelar completamente as cadeias, tornando-o assim mais susceptível a hidrólise. Em contrapartida, Hoover (2001) e Singh *et al.* (2003), afirmam que temperaturas elevadas aumentam substancialmente o grau de cristalinidade e consequentemente a maior estabilidade estrutural das cadeias, levando uma maior resistência dos grânulos de amido a gelatinização.

Ao se diminuir a temperatura de uma dispersão de amido, depois de aquecida, pode-se em certas circunstâncias, observar o fenômeno de retrogradação ou regeneração que corresponde à volta para a condição de insolubilidade, com formação de agregados cristalinos, devido à tendência das cadeias de amilose, principalmente, se reassociarem (PEDRENHO *et al.*, 2008). Isso se deve, segundo Hoover (2001), as interações moleculares principalmente as ligações de hidrogênio da cadeia de amido.

Segundo Atwell *et al.* (1988) *apud* Beninca (2008) a retrogradação do amido é a reassociação das moléculas de amido numa estrutura de duplas hélices, portanto, mais ordenada que sua antecessora, tornando-se menos solúveis. A retrogradação é um fenômeno parcialmente reversível por aquecimento do material cristalizado. No entanto, repetidos ciclos de retrogradação levam a formação de um material

irreversivelmente insolúvel (PEDRENHO *et al.*, 2008). Sob condições favoráveis, esta estrutura ordenada pode se desenvolver em uma forma cristalina, formando partículas de maior tamanho que, por essa razão, podem precipitar (CINELLI, 2012).

Azzini (1984) cita que diferentes autores já pesquisaram o teor de amido no colmo do bambu, esses resultados variam entre 3,38% a 45% de acordo com a espécie e o método de determinação.

A degradação do amido em açúcares mais simples pode ser realizada por via química ou enzimática através da hidrólise, esse processo também é conhecido como sacarificação. O processo hidrolítico adotado dependerá diretamente: da matriz onde o amido se encontra, produto final oriundo desses açúcares e viabilidade econômica do processo.

3.4.2 Liberação do Amido

Na célula vegetal, o amido é armazenado em grânulos microscópicos que não são afetados de maneira perceptível pela água fria e são resistentes também ao ataque enzimático. No entanto, se a parede externa da célula for rompida por algum método mecânico (por exemplo, moagem) e tratada com água aquecida, os grânulos ainda intactos absorvem água, incham e iniciam um processo de desintegração, assim a amilose e amilopectina passam para a solução (PEDRENHO *et al.* 2008).

O amido é classificado em função da sua estrutura físico-química e da sua susceptibilidade à hidrólise enzimática. Segundo Fani (2013), o amido do bambu pode ser assim classificado como amido resistente do tipo 1, isto é, os grânulos são fisicamente inacessíveis na matriz devido as paredes celulares (parênquimas) impedindo ou retardando a ação de enzimas.

Azzini e Gondim-Tomaz (1996) e Azzini (1983) concluíram em seus estudos que o desfibramento do bambu na presença de água é uma etapa essencial para a liberação do amido na solução, pois, como citado no item 3.3.1, o bambu armazena o amido no colmo em células parenquimatosas, que por sua vez são compostas por fibras dificultando assim a migração do amido sem que haja nenhuma ação mecânica. Azzini e Arruda (1986) investigaram tempo, proporção solução/matéria vegetal, temperatura da água para desfibramento e outros parâmetros para melhor eficiência nessa etapa do processo.

A desfibragem dos cavacos é praticamente a única etapa que deve ser incluída no processamento normal do bambu visando a produção de celulose. Para a extração do amido essa etapa é decisiva, pois é durante o desfibramento longitudinal dos cavacos que grande parte dos grânulos de amido são liberados das células parenquimatosas e arrastados pela água (AZZINI; ARRUDA, 1986).

3.4.3 Hidrólise Ácida

3.4.3.1 Generalidades, Interferentes e Subprodutos

A hidrólise química e enzimática em lignoceluloses são estudadas extensivamente por décadas. A oportunidade de se obter açúcar fermentescível em fontes renováveis parece ser um caminho atrativo. A obtenção de açúcar da lignocelulose de produtos residuais de indústrias agrícolas é conveniente porque contém uma grande quantidade de lignina (CURRELI *et al.*, 2002).

Dentre os diferentes métodos de pré-tratamento, a hidrólise dos açúcares presentes na fração hemicelulósica de materiais lignocelulósicos com ácido diluído (sulfúrico, nítrico ou clorídrico) tem se mostrado bastante eficiente, sendo também rápida e simples e tem sido citado como o melhor tipo de pré-tratamento para resíduos industriais (SILVERSTEIN *et al.*, 2007; RAMOS, 2003; PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998). Segundo Gurgel (2010) os processos de hidrólise ácida diluída são aqueles realizados com concentrações do ácido menores que 5% (m/v), enquanto os concentrados são aqueles acima de 5% (m/v). Ácidos concentrados são tóxicos, perigosos, corrosivos, requerendo reatores resistentes à corrosão. Além disso, os ácidos concentrados devem ser recuperados após a hidrólise a fim de tornar o processo economicamente viável (SIVERS e ZACCHI, 1995).

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

Existem, basicamente, dois tipos de tratamento com ácido diluído: tratamento com elevadas temperaturas (superiores a 160°C) em processo de fluxo contínuo

para baixa concentração de sólidos (5 - 10 % peso de substrato/peso de mistura de reação) e tratamento com baixa temperatura (inferior a 160°C) em processo por batelada e alto teor de sólidos (10 – 40%). A hidrólise ácida diluída em condições menos severas pode atingir altas taxas de conversão de xilanas em xilose; já quando altas temperaturas são empregadas, a hidrólise da celulose é favorecida (MCMILLAN, 1994). Um fator importante a ser considerado é que durante a hidrólise ácida diluída, dependendo das condições empregadas, compostos secundários dos açúcares e da lignina podem ser gerados, inibindo o crescimento de microrganismos fermentadores que serão utilizados posteriormente a esta etapa (Figura 22) (MUSSATO; ROBERTO, 2004).

Segundo Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000) *apud* Barcelos (2012) quando altas temperaturas e pressões são utilizadas no pré-tratamento, xilose e glicose podem ser degradadas em furfural e hidroximetilfurfural (5-hidroximetilfurfural ou 5-HMF), respectivamente, os quais podem ser posteriormente degradados em ácido fórmico e levulínico, respectivamente. Além desses compostos outras substâncias tóxicas para os microrganismos podem ser formadas durante a hidrólise com compostos fenólicos que são gerados a partir da quebra parcial da lignina, ácidos siríngico, vanílico, palmítico, entre outros.

A hemicelulose normalmente é muito mais suscetível à hidrólise ácida do que a celulose. Quantidades superiores a 85% de glicose podem ser obtidas da hemicelulose em condições de reação relativamente amenas, com apenas uma pequena parte da celulose sendo convertida a glicose. Condições mais severas são necessárias para atingir níveis altos de glicose a partir da celulose, no entanto, elas levam à degradação do açúcar liberado da hemicelulose, que se encontra no meio reacional, resultando em produtos secundários indesejados, fortes inibidores da fermentação (furfural, 5-HMF, ácido acético, ácido fórmico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vanílico, fenol, formaldeído e outros) (BRETHAUER; WYMAN, 2009).

Delgenes *et al.* (1996) *apud* Barcelos (2012) mostraram que concentrações de furfural de 0,5; 1,0 e 2,0 g/L reduziram o crescimento de *Scheffersomyces stipitis* em 25%, 47% e 99%, respectivamente. Este mesmo estudo com concentrações de 5-HMF de 0,5; 0,75 e 1,5 g/L mostrou uma redução de 43%, 70% e 100% no crescimento de *Pichia stipitis*, respectivamente. Lohmeier-Vogel *et al.* (1998) *apud* Saito (2005) observaram o efeito individual e combinado de furfural, 5-HMF e ácido acético durante a fermentação de xilose por *Pichia stipitis* e *Pachysolen tannophilus*.

Foi observado para *Pachysolen tannophilus* que quando o meio continha furfural (0,3 g/L), 5-HMF (0,9 g/L) e ácido acético (10,9 g/L), sendo estas concentrações similares as encontradas no hidrolisado hemicelulósico de madeira, obteve-se da concentração inicial de xilose (20 g/L) apenas 3% convertida para etanol, 15% para xilitol e o restante para a formação de biomassa CO_2 . Individualmente o comportamento foi diferente para cada microrganismo.

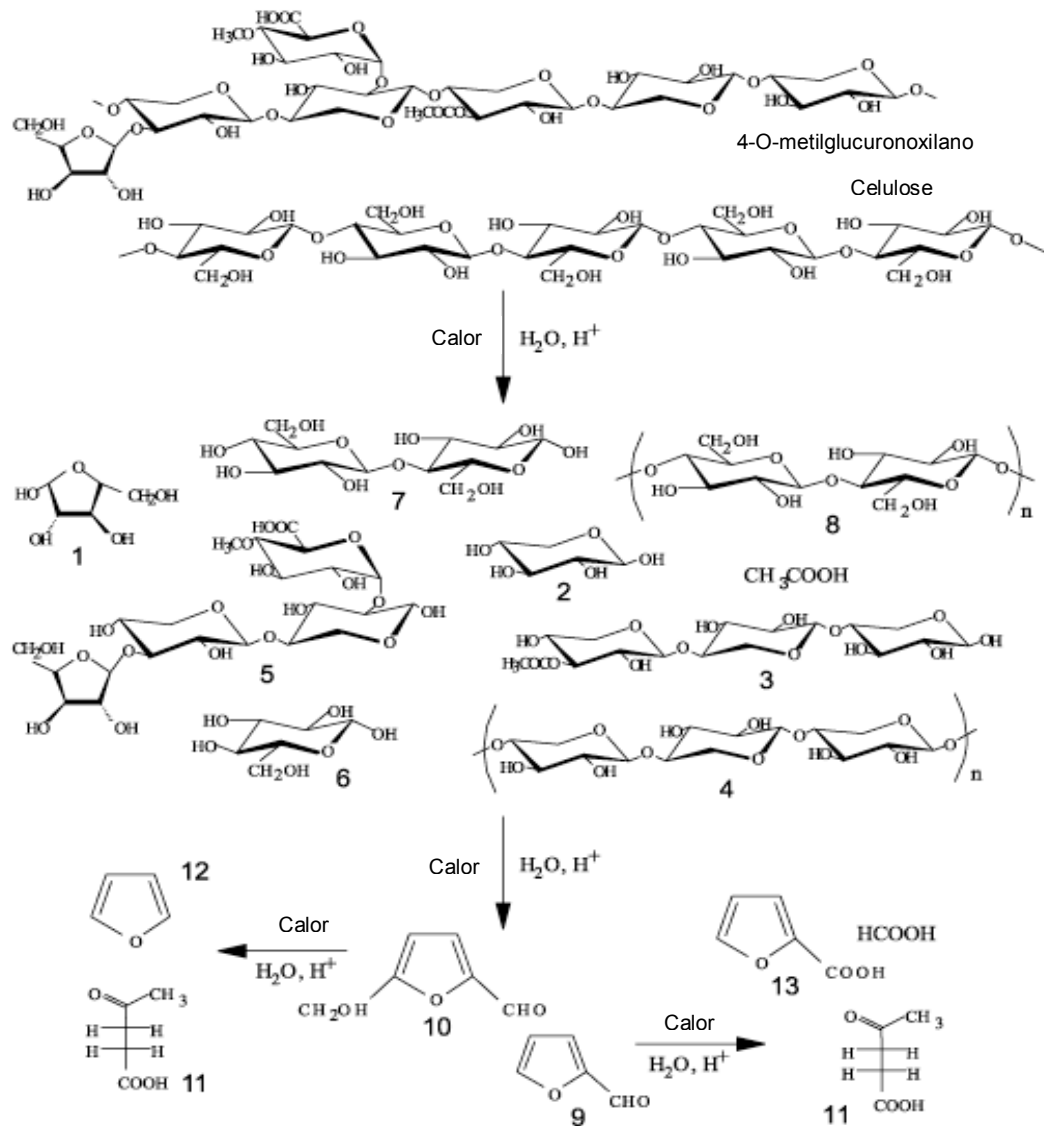


Figura 22 – Hidrólise ácida de 4-O-metilglucuronoxilano (composto da hemicelulose) e Celulose provenientes de madeiras duras sob o tratamento *steam explosion*. (1) arabinose; (2) Xilose; (3) xilooligômeros acetilados; (4) xilooligômeros de alto peso molecular; (5) ácido-oligossacarídeos ramificados; (6) glicose; (7) celobiose; (8) celooligômeros; (9) furfural; (10) 5-hidroximetilfurfural; (11) ácido levulínico; (12) furano e (13) ácido 2-furóico

Fonte: Ramos, 2003

Taherzadeh (1999) *apud* Saito (2005) descreve alguns inibidores para *Saccharomyces cerevisiae*, levedura utilizada para fermentação etanólica. A alta concentração (por volta de 10 g/L) de inibidores como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, decresce o rendimento na produção de etanol. O efeito do ácido acético depende de sua concentração máxima que é de 5 g/L, já em baixa concentração 1 g/L não possui grande influência na fermentação do produto. Os compostos formados pela degradação da hexose e da pentose, furfural e hidroximetilfurfural, inibem a levedura quando estão em concentração de 4 g/L. Alves *et al.* (2014) utilizando-se da mesma levedura em uma fermentação do hidrolisado de madeira de eucalipto, concluíram que apenas o 5-HMF e furfural não são os únicos agentes responsáveis pela mudança metabólica do microrganismo reduzindo o rendimento em etanol.

Dependendo das concentrações de compostos tóxicos, o hidrolisado pode necessitar de algum tipo de tratamento de desintoxicação, como por exemplo, o emprego de resinas de troca iônica, carvão ativado, enzimas ligninolíticas, pré-fermentação com fungos filamentosos, tratamentos com álcalis ou sulfitos, entre outros (MUSSATO; ROBERTO, 2004).

Neste sentido, Sun e Cheng (2002), definem que um bom pré-tratamento de lignocelulósicos atende requisitos como: melhorar a formação de açúcares, evitar a degradação de compostos desejáveis, mitigar a formação de subprodutos inibidores do processo fermentativo subsequente e garantir a melhor viabilidade econômica para o processo. Corroborando o item 3.3.2 que segundo Azzini *et al.* (1987b), o teor de amido do bambu é um grande interferente na fabricação de celulose, reduzindo o rendimento se comparado ao eucalipto e o pinus, entretanto, com um tratamento adequado juntamente com o conceito de biorrefinaria (item 3.3.3) atenderia os conceitos determinados por Sun e Cheng (2002) tornando o bambu mais viável economicamente como matéria-prima para tal finalidade.

Com tais pontos levantados se mostra viável a tentativa de sacarificar o amido do bambu com processo hidrolítico após tratamento mecânico para a liberação dos grânulos, porém, existe a possibilidade real da formação sinérgica de inibidores fermentativos principalmente advindos da hemicelulose, entretanto, com o tratamento adequado podem ser minimizados ou até recuperados, visto que, furfural e 5-HMF são com compostos de valor agregado em diversos segmentos do setor químico.

3.4.3.2 Hidrólise do Amido

Uma alternativa de transformação de resíduos amiláceos em coproduto é a produção de etanol a partir de resíduos agroindustriais, que além de reduzir os impactos ambientais desta atividade, ainda aumenta a produção da indústria alcooleira (NUNES, ARAÚJO; GUARDA, 2014).

De acordo com o Lundubwong e Seib (2000), o amido é rotineiramente removido, dentre outros componentes na indústria de celulose pelo método alcalino, isto é, utiliza-se uma solução de álcali forte para a remoção das substâncias indesejáveis, esse fluido é denominado licor negro. Como visto anteriormente, o bambu por possuir teores consideráveis de amido perante outros materiais lignocelulósicos, diminui o rendimento em celulose e aumenta o consumo desses álcalis.

Este amido não é passível de fermentação pela levedura alcoólica e necessita de transformação a mono e dissacarídeos fermentáveis que podem ser obtidas via ácida ou enzimas amilases, processo denominado hidrólise, etapa imprescindível à formação de açúcar redutor, necessária à fermentação (BRINGHENTI e CABELLO, 2005). Surmely *et al.* (2003) relatam inúmeras vantagens da hidrólise enzimática a ácida como: menor gasto energético do processo, menor produção de subprodutos indesejados e menor produção de sal na neutralização, porém, se confronta com o alto valor do investimento inicial, das enzimas utilizadas, da mão de obra mais especializada e de laboratório mais sofisticados, tornando-se assim uma restrição para esse processo.

Atualmente, a hidrólise com ácido diluído vem sendo amplamente abordada na literatura, sendo os ácidos, sulfúrico (H_2SO_4) e o clorídrico (HCl) normalmente os mais empregados (XIANG, 2002). Um maior interesse na utilização destas soluções diluídas reside no benefício econômico proporcionado por este processo, já que o baixo consumo de ácido diminui os custos com matéria-prima e equipamentos, devido à menor corrosividade destes (GURGEL, 2010).

O processo de hidrólise ácida realizado por Saito (2006) aponta o tratamento hidrotérmico, sob condições de catalise ácida (H_2SO_4), do amido residual do farelo de mandioca para produção de hidrolisado rico em glicose com a finalidade de

posterior fermentação do mesmo e, obteve uma recuperação do amido residual de 102,9%.

A cinética de clivagem das ligações glicosídicas por ácidos depende basicamente da concentração e do tipo de ácido utilizado, assim como da temperatura, tempo do processo e consistência dos grânulos (PEDRENHO *et al.*, 2008; BARROS, 1984). A hidrólise ácida do amido é considerada, em linhas gerais, como aleatória porque todas as ligações glicosídicas do amido são igualmente susceptíveis à clivagem, levando à formação de α -D-glicose. No entanto, existem informações que, em condições não muito energéticas, as ligações α -1,6 são 1 a 10 vezes mais resistentes ao rompimento que as ligações α -1,4 e que as ligações mais internas resistem um pouco mais (cerca de 1,8 vezes) que os terminais redutores da molécula (PEDRENHO *et al.*, 2008). Barros (1984) descreve que a formação de mono e oligossacarídeos se dá no final da cadeia de amido, e que, a formação de D-glicose, maltose e maltotriose é praticamente idêntica no primeiro estágio da hidrólise (Figura 23).

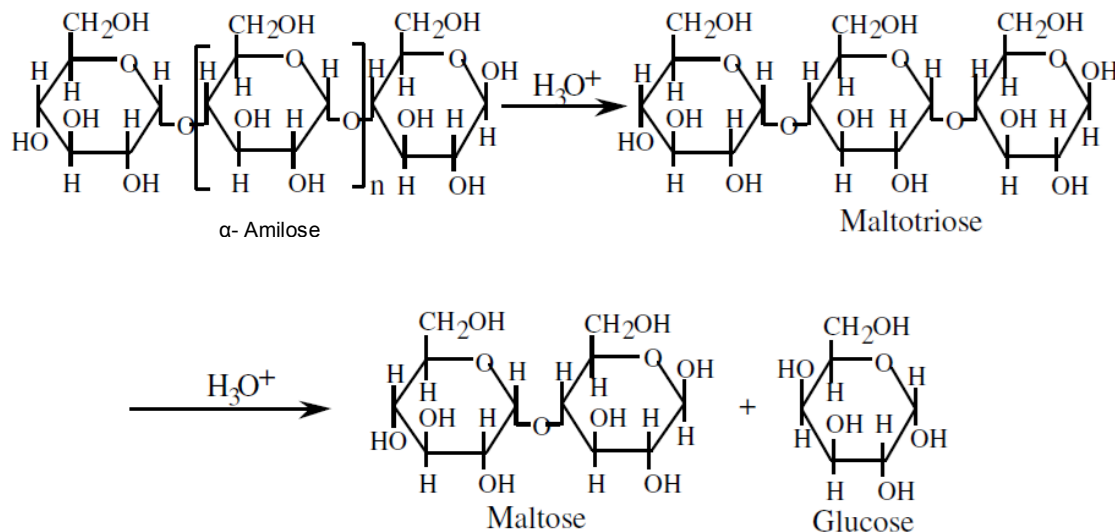


Figura 23 – Etapas da hidrólise da amilose

Fonte: www.ice.ufrj.br/posgrad/pdf/Arquivos_II_ENC/terça/ProfNelson1.pdf

Com a obtenção da solução com carboidratos mais simples, provenientes da hidrólise ácida do amido contido na biomassa vegetal do bambu, se faz necessária a fermentação para obtenção de bioetanol.

3.4.4 Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é uma transformação bioquímica de glicídios a etanol e CO₂ levada a cabo pela célula viva, em particular por células de leveduras, fungo amplamente distribuído na natureza e com capacidade de sobrevivência tanto em condições aeróbias ou anaeróbias (PEREIRA JR., 2008 *apud* BARCELOS, 2012). Historicamente, os microrganismos mais comumente utilizados na fermentação alcoólica têm sido as leveduras do gênero *Saccharomyces* e, dentre essas, *Saccharomyces cerevisiae* a principal espécie (CINELLI, 2012).

As leveduras são organismos eucariotos e suas estruturas correspondem basicamente às daquelas de outras células eucarióticas. As células são esféricas, elípticas ou cilíndricas, variando grandemente em suas dimensões. A reprodução ocorre por gemação, esporulação ou fissão, sendo mais comum a gemação ou brotamento (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Entre os açúcares fermentescíveis pelas leveduras estão os monossacarídeos glicose, frutose, manose e galactose, bem como os dissacarídeos maltose e sacarose e os trissacarídeos rafinose e maltotriose (dependendo da cepa). Polissacarídeos como amido e celulose não são metabolizados por leveduras (RUSSELL, 2003).

A produção de álcool etílico no Brasil ultrapassa 28 bilhões de litros, e levando-se em consideração que a principal via de obtenção deste produto é derivada de processo fermentativo, tem-se uma grande preocupação com o agente responsável pela fermentação (BARCELOS, 2012; CONAB, 2015).

Jones *et al.* (1981) descrevem que as leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* e a bactéria *Zymomonas mobilis* são os microrganismos mais propícios a produção de etanol a partir de hexoses, o mesmo também cita que a espécie *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum* (*S. carlsbergensis*) se destacam nesse gênero.

Porém, segundo Cinelli (2012) o gênero *Saccharomyces* além de possuir características descritas por Pereira Jr. *et al.* (2008) de suma importância para o bioprocessamento em escala industrial como: conversão rápida de substrato em produto, alto rendimento, tolerância alcoólica, estabilidade sob condições de elevada pressão osmótica e robustez a inibidores, são consideradas como GRAS (*generally*

recognized as safe), isto é, podem ser utilizadas também em alimentos para consumo humano como aditivo.

A principal via metabólica envolvida na produção do etanol em leveduras é a via glicolítica (Embden-Meyerhof): uma sequência de reações catalisadas por enzimas, em que para cada molécula de glicose metabolizada, duas moléculas de piruvato são produzidas no citoplasma da célula (Figura 24) (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

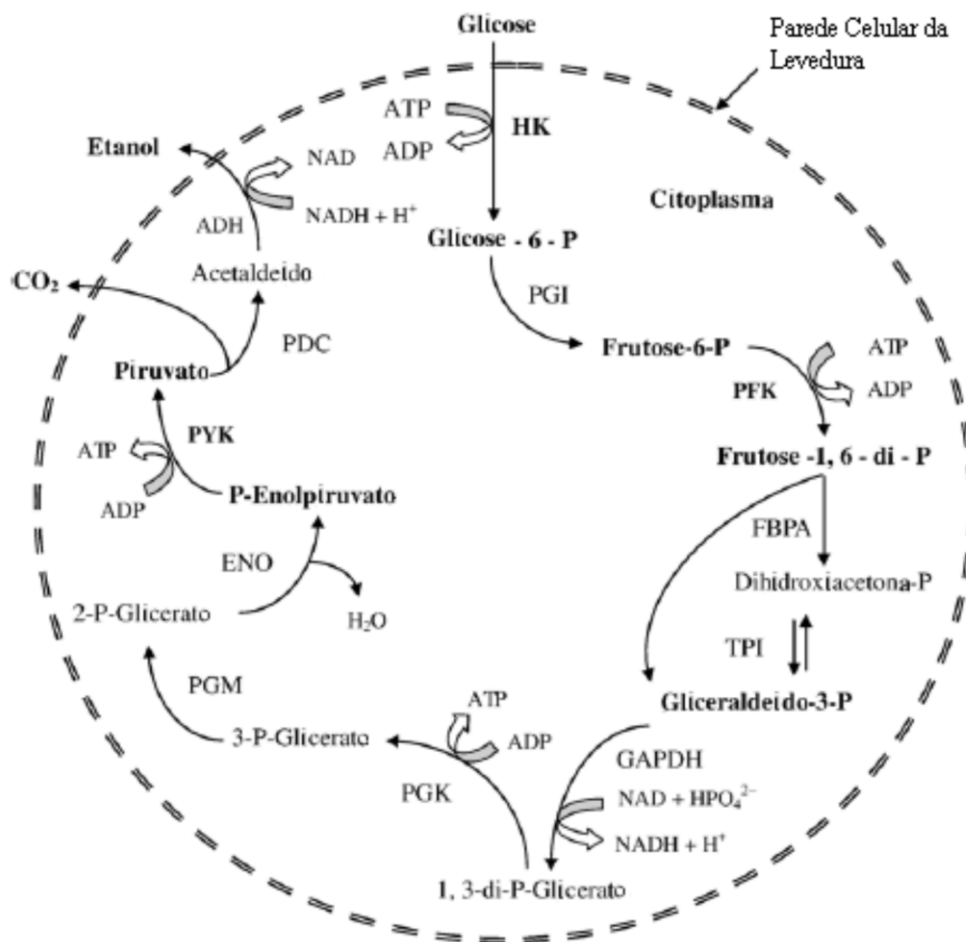


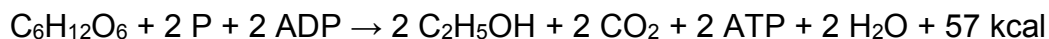
Figura 24 – Via metabólica da fermentação de etanol em *S. cerevisiae*. Abreviações: HK: enzima hexoquinase, PGI: fosfoglucoisomerase, PFK: fosfofrutoquinase, FBPA: frutose bifosfato aldolase, TPI: triose fosfato isomerase, GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, PGK: fosfoglicerato quinase, PGM: fosfoglicomutase, ENO: enolase, Pyk: piruvato quinase, PDC: piruvato descarboxilase, e ADH: álcool desidrogenase

Fonte: Bai, Anderson e Moo-Young., 2008

Quando o oxigênio é suficiente e a concentração de substrato é baixa, pouco ou nenhum etanol é produzido e a levedura segue a fosforilação oxidativa (respiração aeróbia), com o oxigênio comoceptor final de elétrons. Os açúcares

são utilizados para produção de energia e crescimento celular. Entretanto, quando há a ausência de oxigênio (anaerobiose) ou alta concentração de glicose, o etanol é o principal produto final (CINELLI, 2012)

Em anaerobiose (Equação de Gay-Lussac)



Segundo Ribeiro, Lopes e Ferrari (1987) *apud* Saito (2005) as células de leveduras apresentam necessidades nutricionais durante o processo fermentativo, as quais influenciam diretamente na multiplicação e no crescimento celular e também na eficiência da transformação de açúcar em álcool. As leveduras são capazes de assimilar, mono, di e trissacarídeos e como são aeróbias facultativas, os produtos finais da metabolização dos açúcares irão depender das condições ambientais em que ela se encontra. Uma fração do açúcar é transformado em: biomassa, CO₂ e H₂O em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO₂ em anaerobiose (fermentação alcoólica). Juntamente com o etanol e CO₂, o metabolismo anaeróbio permite a formação e excreção de glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros), alcoóis superiores, acetaldeídos, acetoína, etc. e simultaneamente ocorre o crescimento das leveduras. Estima-se, que 5% do açúcar metabolizado pela levedura seja desviado para gerar tais produtos secundários da fermentação.

Os subprodutos, tais como glicerol, ácidos orgânicos e alcoóis superiores, são produzidos em pequena quantidade em relação à quantidade de etanol. A produção destes subprodutos, bem como o crescimento e manutenção celular, inevitavelmente, direciona intermediários da via glicolítica para as vias metabólicas correspondentes, diminuindo a produção de etanol. Na indústria, a eficiência de conversão em etanol, calculada tendo como referência o rendimento de 51,1%, chega a 90-93 %, devido, principalmente, ao crescimento celular e à produção de produtos finais de metabolismo secundário (INGLEDEW, 1999).

A produção de glicerol por fermentação de levedura é conhecida desde as investigações de Pasteur em 1858 (Tabela 3) (CINELLI, 2012). A sua formação está ligada a produção de succinato e de acetato, compostos cuja síntese está acompanhada de uma produção de NADH (BARRE *et al.*, 2000).

Tabela 3 – Proporção dos diversos produtos da fermentação alcoólica, em g/100g de glicose metabolizada, de acordo com várias fontes e para diferentes eficiências fermentativas.

Produtos da fermentação	Pasteur (rendimento 95%)	Jackman, 1987 (rendimento 90-95%)	Basso <i>et al.</i> 1996 (rendimento 85-92%)
Etanol	48,5	45,0 – 49,0	43,0 – 47,0
Gás carbônico	46,4	43,0 – 47,0	41,0 – 45,0
Glicerol	3,3	2,0 – 5,0	3,0 – 6,0
Ácido succínico	0,6	0,5 – 1,5	0,3 – 1,2
Ácido acético	-	0,0 – 1,4	0,1 – 0,7
Óleo fúsel	-	0,2 – 0,6	-
Butilenoglicol	-	0,2 – 0,6	-
Biomassa (massa seca)	1,2	0,7 – 1,7	1,0 – 2,0

Fonte: Lima *et al.*, 2001

Em *Saccharomyces cerevisiae*, o glicerol é um subproduto da fermentação alcoólica, com o papel de manter o balanço redox citossólico da célula, especialmente em condições anaeróbias, compensando reações celulares que produzem NADH (VAN DIJKEN; SCHEFFERS, 1986). O glicerol atua, ainda, na pressão osmótica do meio e seu acúmulo é muito importante para a sobrevivência durante o estresse osmótico. O aumento da temperatura, entre outros estresses, faz com que a célula de levedura produza maiores quantidades de glicerol. Industrialmente, em uma fermentação de etanol combustível, os níveis de glicerol podem chegar a 15 g/L (RUSSELL, 2003).

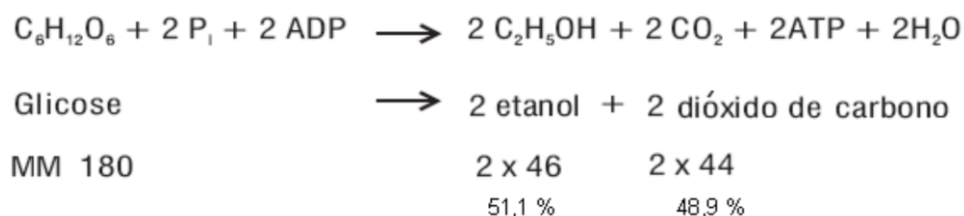


Figura 25 – Rendimento teórico da fermentação anaeróbia

Fonte: Cinelli, 2012

Desta forma, em condições anaeróbias ou em elevada concentração de glicose, o piruvato é convertido a etanol com a liberação de dióxido de carbono. Teoricamente, pode ser obtido até 51,1 % de etanol e 48,9 % de CO₂ em base

mássica (Figura 25), em relação à glicose metabolizada, e, ainda, são produzidos na glicólise dois moles de ATP (adenosina tri-fosfato) por mol de glicose, usados para a manutenção energética das células (CINELLI, 2012). O etanol representa o produto principal da fermentação alcoólica e pode alcançar concentrações extracelulares de até 12 a 14% de volume em fermentação normal (BARCELOS, 2012).

Outras fontes nutricionais como as vitaminas tais como biotina, riboflavina, niacina, tiamina, entre outras, são importantes reguladores e cofatores de diversos processos metabólicos. Entre os íons inorgânicos que atendem a demanda pelos macro e micronutrientes necessários para o crescimento de leveduras, estão o fósforo e o enxofre, além de importantes cátions, como zinco, manganês, magnésio, cálcio, cobre, potássio e ferro (CINELLI, 2012).

As leveduras são capazes de crescer em uma ampla faixa de temperatura (entre 5°C e 43°C) (Figura 26). Algumas cepas comerciais alcooleiras apresentam boa capacidade de fermentação em temperaturas da ordem de 32-35°C. Em altas temperaturas a atividade metabólica diminui rapidamente. As leveduras preferem um pH ácido e seu pH ideal é 5,0-5,2, mas cepas de cervejaria e alcooleiras são capazes de apresentar um bom crescimento na faixa de pH de aproximadamente 3,5 a 6,0 (RUSSELL, 2003).

Alguns fatores podem influenciar diretamente a fermentação além da falta de micro e macro nutrientes. Segundo Porto (2005) dois efeitos que apresentam efeito inibitório na taxa de crescimento da levedura é o etanol (produto) quando acima de 10% p/v e o substrato este acima de 150 g/L.

Durante o pré-tratamento do material lignocelulósico ou nos processos de hidrólise catalisada por ácidos, não somente se obtém os açúcares provenientes da hidrólise e dissolução da celulose e hemicelulose. Por causa das altas temperaturas e condições ácidas nas que se desenvolvem estes pré-tratamentos, se originam uma série de compostos que podem atuar como inibidores potenciais da fermentação. A natureza e concentração destes compostos dependem do tipo de matéria-prima (conteúdo percentual de celulose, hemicelulose e lignina), do pré-tratamento utilizado, das condições do processo (temperatura e tempo de reação) e do emprego ou não de catalisadores ácidos. Os produtos de degradação, que são potenciais inibidores da fermentação, se agrupam em três categorias (PEREIRA JR. *et al.*, 2008): derivados do furano, ácidos alifáticos de baixa massa molecular e derivados fenólicos.

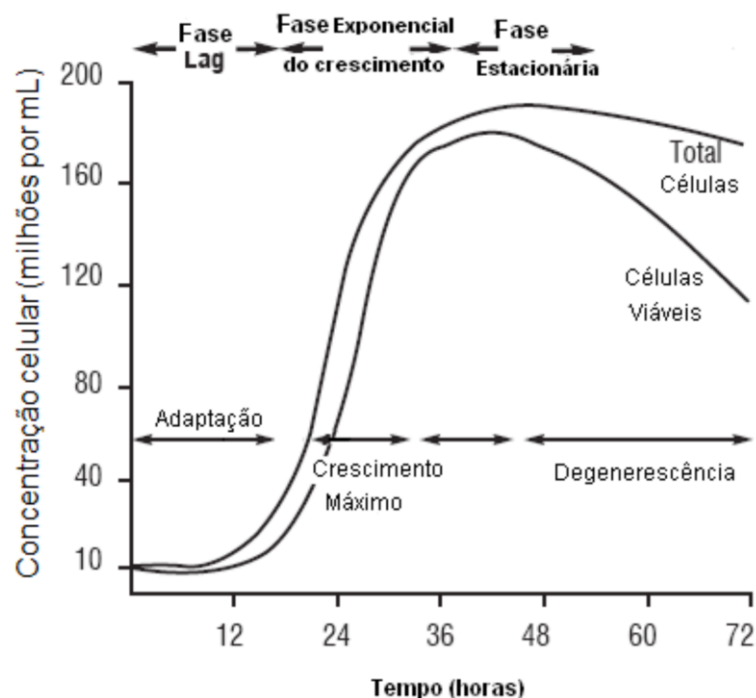


Figura 26 – Curva típica de crescimento de levedura

Fonte: Russell, 2003

Em consequência das altas temperaturas empregadas nos pré-tratamentos, os açúcares originados na hidrólise, principalmente da hemicelulose, se degradam originando os compostos derivados do furano: o furfural, formado a partir da degradação das pentoses (xilose e arabinose) e o 5-HMF, formado como consequência da degradação das hexoses (glicose, manose e galactose). Por sua vez, estes dois compostos podem-se degradar a outros produtos. O furfural pode se degradar a ácido fórmico ou se polimerizar. O 5-HMF origina quantidades equimoleculares de ácidos fórmico e levulínico. Ademais destes dois ácidos alifáticos (fórmico e levulínico), forma-se ácido acético procedente da hidrólise dos radicais acetila da hemicelulose. O teor destes inibidores no licor, após o pré-tratamento depende da natureza do material lignocelulósico empregado (BARCELOS, 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos foram realizados segundo o fluxograma descrito na Figura 27. Após coleta e limpeza (remoção das folhas e ramas), os colmos do bambu foram picados, convertidos a cavacos e encaminhados a secagem. A 1ª Etapa dos experimentos foi avaliar a remoção do amido do colmo por dois sistemas de remoção com água quente: aberto sem pressão e semiaberto com pressão de 1Kgf/cm². Seguindo a 2ª Etapa, outras variáveis e etapas dentre elas a moagem da matéria-prima, desfibramento e hidrólise ácida sob pressão de 1Kgf/cm² foram estudadas e comparada. As frações líquidas resultante foram neutralizadas e àquela de maior teor de açúcares redutores totais foi adicionada de nutrientes, esterilizada e fermentada com *S. cerevisiae*. As frações fibrosas resultante dos experimentos foram separadas por filtração e as mais relevantes tratadas e caracterizadas junto a amostra *in natura* em pó.

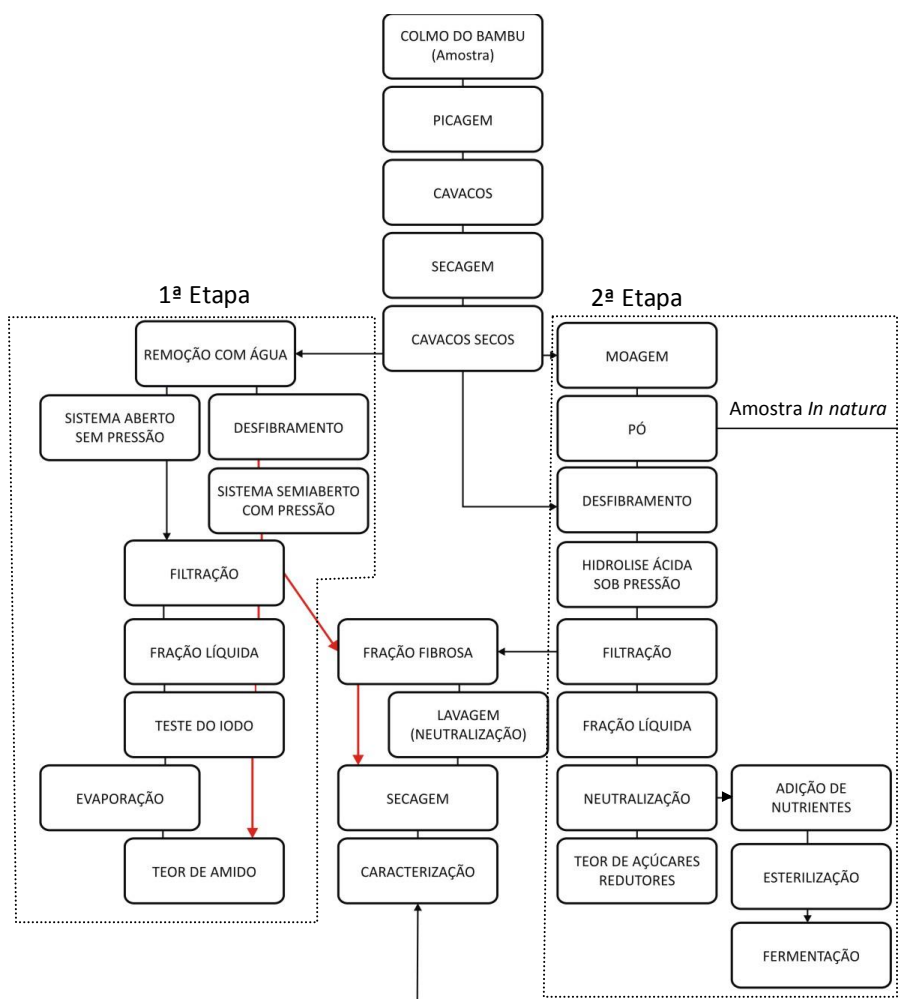


Figura 27 – Fluxograma geral do estudo realizado

Os experimentos com análises cromatográficas foram realizados no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), a termogravimetria (TGA) no Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos do Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFPE, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental – UFPE e as demais foram conduzidas nos laboratórios de Farmácia Viva e Bromatologia do Centro Acadêmico de Vitória (CAV) - UFPE.

4.1 MATÉRIA-PRIMA

Os colmos de bambu da espécie *Bambusa vulgaris* foram coletados em 20 de maio de 2015 e 08 de novembro de 2015 no distrito de Bonança, pertencente ao município de Moreno no estado de Pernambuco. Os colmos, após coleta, foram processados em um triturador de resíduos orgânicos mostrado na Figura 28 (marca Trapp; modelo TR200) se tornando cavacos (Figura 29), entretanto, por conta da limitação do equipamento, apenas colmos com no máximo uma polegada (1”) foram triturados. Para a transformação em pó (Figura 30), os cavacos foram pulverizados em moinho de facas tipo Wiley (Solab; SL32).



Figura 28 – Triturador utilizado para os colmos do bambu



Figura 29 – Colmos do bambu após trituração em cavacos



Figura 30 – Colmos do bambu após pulverização

Após processamento, o primeiro lote de cavacos foi armazenado em caixa tipo *box* feita em polietileno de alta densidade. Devido ao lacramento da caixa, passadas 48 horas a amostra se mostrou com odor de silagem⁵ e visível proliferação microbológica sendo assim descartada. Por conta do ocorrido, o segundo lote de cavacos foi posto em estufa de aquecimento com circulação forçada (Fanem; 320e) a $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 60 horas logo após seu processamento, com a redução de umidade foi possível uma estocagem adequada do material.

⁵ Produto final da fermentação da massa de forragem sem a presença de oxigênio, realizada por bactérias, que consomem, principalmente, os açúcares disponíveis no material.

Antes das análises o bambu processado (cavaco e pó), mais uma vez foi submetido ao tratamento térmico, desta vez em estufa (Sterilifer; SX) a $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ até peso constante para a total remoção da umidade, para que as determinações sejam calculadas em base seca.

4.2 REMOÇÃO DO AMIDO

A remoção do amido na biomassa vegetal teve como finalidade a obtenção direta ou indireta desse carboidrato, para posteriormente ser utilizado como fonte de carbono na fermentação e produção de etanol, assim como, promoveu a remoção de um interferente na produção de papel e celulose quando utilizado o bambu como matéria-prima para esse fim.

4.2.1 Extração com Água

A extração teve como objetivo a remoção e quantificação de todo o amido da matriz de forma direta apenas utilizando água quente ($95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) como solvente.

4.2.1.1 Pré-Avaliação na Decocção do Bambu em Sistema Aberto

Foi realizado inicialmente testes com o objetivo de avaliar a possibilidade de se extrair o amido do bambu apenas com água e calor e posteriormente hidrolisá-lo. Para isso, 100g de amostra em forma de cavacos foi utilizada para 900ml de água (1:9), essa mistura foi posta em Becker de 1000ml e levado a banho-maria (Tecnal;Te-056mag) já pré-aquecido a $95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. A mistura foi agitada com bastão de vidro de 10 em 10 minutos até o tempo de 60 minutos. Decorrido o tempo, a parte insolúvel (fração fibrosa) foi retida em peneira após filtração e o extrato (fração líquida) recebido em Becker de 2000ml. O procedimento foi repetido mais uma vez. Após total escoamento do extrato, a fração fibrosa desta vez foi lavada com água fervente ($95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) utilizando-se 5 (cinco) porções de 220ml até completar-se 1100 ml, volume pelo qual o teste do iodo em solução alcoólica a 1% (m/v) não detectou mais a presença de amido nem no extrato nem no bagaço. Os extratos obtidos desse procedimento foram evaporados em estufa a 45°C até a soma deles

alçarem um volume menor que 2000ml. As soluções extraídas foram unidas em balão de 2000ml e com água destilada aferido.

O amido extraído foi quantificado de forma direta seguindo a metodologia descrita por Figueira e Hirooka (2000) com modificações. O procedimento foi realizado adicionando em tubo de ensaio 0,5 ml da amostra, 0,45 ml da solução indicadora (1,67 ml de ácido clorídrico concentrado + 3,6g iodeto de potássio + 1,27g de iodo ressublimado e completado para 1000ml com água destilada) e 5 ml de água destilada. O tubo foi agitado em vórtex e lido em 640nm no espectrofotômetro (ThermoScientific; Genesys 10S UV-Vis). Os pontos da curva para essa determinação foram calculados pelas diluições a partir de uma solução-mãe de amido solúvel PA 1% (g/L).

4.2.1.2 Decocção do Bambu em Sistema Semiaberto Sob Pressão

A extração com adição da pressão em sistema semiaberto foi avaliada para possível melhoria na eficiência do processo em comparação ao anterior. Deste modo, foi realizada, antes das decocções, o procedimento de desfibramento que, segundo Azzini e Gondim-Tomaz (1996), são indispensáveis ao processo. A proporção de 66,6g de bambu em forma de cavacos para 2000ml de água (1:30) foi adotada que, segundo Azzini e Arruda (1986), se mostrou a melhor proporção massa/amostra para essa matriz.

O desfibramento foi realizado em liquidificador industrial (Siemens; Skymssen) com amostra previamente pesada (66,6g) por 90 segundos e 600ml de água destilada (Figura 31). Com o auxílio de mais 400ml de água a pasta formada foi transferida para o reator e ao mesmo foi adicionado mais 1000ml de água tornando-se a proporção estabelecida de 1:30. Foi empregado a pressão de 1 kgf/cm², o tempo de 60 minutos (após atingida a pressão de trabalho) e temperatura de 121°C para cada extração. Passado o tempo, o material foi filtrado em peneira revestida com um tecido de algodão tipo chita. Após cada extração, uma pequena alíquota da fração líquida foi tomada e a essa adicionada uma solução de iodo a 1% (m/v) para avaliação da presença/ausência de amido remanescente. As extrações foram repetidas até total remoção do carboidrato da biomassa vegetal, sendo seu teor quantificado semelhante ao item 4.2.1.1. em cada uma das extrações realizadas.



Figura 31 – Bambu em cavaco: a) antes e b) depois do desfibramento

O reator supracitado foi confeccionado a partir de uma panela de pressão com revestimento interno de Teflon®, capacidade nominal de trabalho 1 kgf/cm² e volume total de 4500 ml, na mesma foi adaptado um manômetro da marca Wika® com escala de 0 a 10 kgf/cm² com subdivisões de 0,2 (Figura 32).

A biomassa vegetal residual do experimento foi seca em estufa a 105°C ± 5°C até remoção total da umidade e encaminhada para caracterização e análises de Microscopia Óptica, TGA e MEV juntamente a amostra de bambu *in natura* e outras para a comparação de resultados.



Figura 32 – Reator confeccionado para os experimentos com manômetro em destaque

4.2.2 Extração e Sacarificação por Hidrólise Ácida

Essa etapa teve como objetivo tentar remover todo o amido da matriz de forma indireta, isto é, hidrolisando-o a açúcares mais simples utilizando um ácido mineral diluído, calor e pressão.

As hidrólises ácidas foram conduzidas pela composição de métodos descritos por Azzini e Arruda (1986) e Azzini e Gondim-Tomaz (1996), com o incremento de 1kgf/cm² de pressão. Pedrenho *et al.* (2008) citam que o aumento da pressão, que é sinérgico ao aumento da temperatura, está em consonância ao aumento do rendimento em glicose para a hidrólise do amido.

4.2.2.1 Hidrólise em Sistema Semiaberto Sob Pressão

O bambu foi hidrolisado por via ácida em proporção 1:30 (66,65g de biomassa vegetal para 2000ml de solvente) em reator semiaberto sob diferentes condições seguindo um planejamento fatorial 2³ em duplicata (Tabela 4), sendo as variáveis de entrada a concentração de ácido sulfúrico, tempo de reação e forma. Antes de cada batelada, todas as amostras foram desfibradas (item 4.2.1.2) e posteriormente adicionado 1000 mL da solução ácida com o dobro da concentração de trabalho, para que desta maneira, a concentração de ácido (Tabela 4) e a proporção 1:30 por fim sejam atingidas. Diferentemente de Azzini e Arruda (1986) houve o incremento de 1 kgf/cm² de pressão e a temperatura de trabalho foi 121°C.

Tabela 4 – Variáveis independentes do planejamento fatorial 2³

Variáveis independentes	Níveis	
	-	+
Tempo (min)	50	100
Concentração da Solução de H ₂ SO ₄ (% v/v)	1	2
Forma	Pó	Cavaco

Após a batelada, o sistema foi despressurizado rapidamente para a ocorrência de um *flash*⁶ para a possível remoção ou minimização dos teores de furfural e 5-hidroximetilfurfural por arraste de vapor. A mistura foi filtrada em tecido de algodão tipo chita sobreposto a uma peneira. Toda a fração fibrosa foi retida e o extrato recebido em Becker de 2000ml, por sua vez, para possível aumento de rendimento, a fração fibrosa foi lavada com 3 porções de 100ml de água fervente ($95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) cada e o tecido contendo a fração fibrosa prensado até total remoção da fração líquida. O resfriamento foi aguardado e a fração líquida transferida para um balão volumétrico de 2000 ml e com água destilada aferido. No extrato hidrolisado foi realizada a quantificação de açúcares redutores totais (ART) pelo método DNS descrito por Miller (1959) como variável de resposta dos experimentos do planejamento.

A partir dos resultados obtidos e tratados estatisticamente com a análise de variância (ANOVA), visando o menor custo e melhor rendimento para o processo foi explorado uma variação da concentração do ácido (Tabela 5), foi mantido constante o tempo e forma do ponto ótimo. Foi agrupado os novos e os resultados anteriores e novamente foram tratados com ANOVA.

Tabela 5 – Explicação de uma das variáveis independentes

Variável	Níveis	
	-	+
Concentração de H_2SO_4 (% v/v)	0,5	5,0

Com água destilada corrente foram lavadas, até a neutralização do ácido, duas porções de aproximadamente 50g das frações fibrosas obtidas na hidrólise de maior formação em ART e do experimento com a condição hidrotérmica e química mais agressivas. Após seca em estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ as amostras seguiram os testes citados no item 4.3 para comparação com a amostra *in natura*.

Os inibidores de fermentação furfural e 5-hidroximetilfurfural foram mensurados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com bomba Millipore 510 e detector Dynamax UV-1 com coluna de fase reversa Hawlett-Packard

⁶ Processo de simples estágio que consiste na vaporização, por redução da pressão, de uma fração do material a ser separada, quando o material é multicomponente o vapor obtido é rico em componentes mais voláteis do que é o líquido remanescente.

RP-18 (C-18) usando a metodologia descrita por Gouveia *et al.* (2009) apenas no ponto ótimo, ou seja, aquele de maior rendimento em ART.

4.2.2.2 Hidrólise em Sistema Fechado no Ponto Ótimo (Teste de Eficiência do Flash)

Hidrólises ácidas foram realizadas em frascos Schott® de 500ml para a quantificação do teor de furfural e 5-hidroximetilfurfural. Os resultados foram comparados aos do item 4.2.2.1. e foi medida a eficiência do *flash*.

As condições de hidrólises foram 1:30 (8,32g para 250ml de solução ácida). O tempo, concentração do ácido e forma da biomassa vegetal utilizados foram a do ensaio de melhor formação de açúcares redutores totais do item 4.2.2.1 e as mesmas foram realizadas em autoclave (Phoenix; AV50).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL

O bambu *in natura* foi caracterizado quanto aos seus teores de: celulose, hemicelulose, lignina, extrativos, entre outros. Além da amostra *in natura* foram caracterizadas as frações fibrosas provenientes dos itens 4.2.1.2 e 4.2.2.1, nesse último sendo duas amostras: uma proveniente da hidrólise de maior formação em ART e outra na condição hidrotérmica e quimicamente mais agressivas. Os parâmetros analisados e seus métodos estão descrito no Quadro 3.

Quadro 3 – Parâmetros e metodologias adotadas para a caracterização da biomassa vegetal

Constituinte	Metodologia
Celulose	Araujo <i>et al.</i> (2013) e Gouveia <i>et al.</i> (2009)
Hemicelulose	Araujo <i>et al.</i> (2013)
Lignina Total	Klason modificado por Rocha (1997) e Gouveia <i>et al.</i> (2009)
Cinzas	TAPPI T211 om-97
Extrativos Totais	-
Extrativos em Hexano:Etanol (1:1)	Francisco e Curvelo (2009)
Extrativos em Água Quente	Bonora, Almeida e Brito (2011)
Extrativos em Água Quente após Hexano:Etanol	Bonora, Almeida e Brito (2011)
Umidade	-

Antes do início da caracterização, 50g as amostras do item 4.2.2.1 foram lavadas com água destilada corrente até a neutralização do ácido. Todas as amostras envolvidas na caracterização foram encaminhadas a estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas até remoção total da umidade, para que os cálculos pudessem ser realizados em base seca.

4.3.1 Celulose e Hemicelulose

Foi pesado em Becker, previamente tarado, 4g da amostra livre de extrativos em balança analítica (BEL; Mark210A) e foram adicionados: 55ml de água destilada, 7ml de ácido acético glacial e 10ml de Hipoclorito de Sódio a 6% . O Becker com a amostra e reagentes foi encaminhado para o banho-maria a 75°C por 30 minutos sendo agitado com bastão de vidro de 5 em 5 minutos. Após o tempo determinado, o conteúdo do Becker foi vertido para um cadinho de vidro de placa porosa previamente tarado e seco e se aguardou a fração líquida escoar. Esse procedimento foi repetido 6 vezes até que o resíduo sólido se apresentou esbranquiçado indicando o final da reação desejada. O cadinho de vidro de placa porosa, contendo o resíduo, foi lavado com 500ml de água destilada e levado a estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 2 horas. Após o tempo e o resfriamento o cadinho foi pesado. O cálculo realizado demonstra o teor de holocelulose (celulose + hemicelulose).

$$\text{Holocelulose (\%)} = \frac{M_{fr} - M_{fv}}{M_a} \times 100 \quad (\text{Eq.1.0})$$

Onde:

Mfr: Massa do funil com resíduo

Mfv: Massa do funil vazio

Ma: Massa da amostra

A celulose foi determinada transferindo-se 2g do resíduo da determinação de holocelulose para um Frasco de Erlenmeyer, ao mesmo foi adicionado 100ml de hidróxido de potássio a 15% m/v fervente ($95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). O conjunto foi levado a chapa de aquecimento (Solab; LS-91) para ebulição suave por 30 minutos.

Decorrido esse tempo, o material foi filtrado em papel de filtro (faixa preta) previamente seco em estufa $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 1 hora e pesado em pesa-filtro. A fração líquida (hemicelulose) foi desprezada. A fração sólida retida no papel de filtro (celulose) foi lavada com 200ml de água destilada fervente ($95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). O papel de filtro com a celulose foi levado no pesa-filtro a estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 2 horas. Após o tempo e o resfriamento o conjunto filtro + pesa-filtro foi pesado. O cálculo realizado demonstra o teor de celulose e por diferença pode-se obter o valor de hemicelulose.

$$\text{Celulose (\%)} = \frac{M_{pr} - M_{pv}}{M_a} \times 100 \quad (\text{Eq.1.1})$$

$$\text{Hemicelulose (\%)} = \text{Holocelulose (\%)} - \text{Celulose (\%)} \quad (\text{Eq.1.2})$$

Onde:

Mpr: Massa do papel de filtro + pesa-filtro com resíduo

Mpv: Massa do papel de filtro + pesa-filtro vazio

Ma: Massa da amostra

4.3.2 Lignina Total

Foi pesado em Becker de 100ml, previamente tarado, 2g da amostra sem extrativos, 10ml de H_2SO_4 a 72% (v/v) foi adicionado ao Becker e encaminhado para o banho-maria a 45°C por 7 minutos sob agitação constante com bastão de vidro. Transcorrido o tempo o conteúdo do Becker foi vertido para frasco Schott® de 500ml. Ao mesmo foi adicionado 275ml de água destilada e foi autoclavado por 30min a 121°C .

Após a remoção do material da autoclave e posteriormente resfriamento a temperatura ambiente, foi filtrado em papel de filtro faixa preta (seco e previamente pesado em pesa-filtro) sendo retida a fração sólida (lignina insolúvel) e coletada a fração líquida em balão volumétrico de 500ml lavando a fração sólida até o volume demarcado. O balão com a fração líquida foi reservado para a determinação da lignina solúvel. A fração sólida foi lavada com mais 2000ml de água destilada para total neutralização do ácido ($\text{pH} \approx 7,0$) sendo medida com papel de tornassol. A

lignina total foi obtida através dos procedimentos descritos nos itens 4.3.2.1 e 4.3.2.2 através da Equação 2.0.

$$Lignina\ Total\ (\%) = Lignina\ Insolúvel\ (\%) + Lignina\ Solúvel\ (\%) \quad (Eq.2.0)$$

4.3.2.1 Lignina Insolúvel

Após a lavagem o papel de filtro contendo o resíduo foi levado para estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ em pesa-filtro até massa constante. O valor obtido correspondeu à massa de lignina insolúvel com cinzas (Mk).

$$Mk(g) = M_{pf} - M_{pv} \quad (Eq.2.1)$$

Onde:

M_{pf}: Massa do papel de filtro + pesa-filtro com resíduo

M_{pv}: Massa do papel de filtro + pesa-filtro sem resíduo

O papel de filtro com resíduo depois da determinação de Mk foi transferido para cadinho previamente seco e pesado para forno mufla (Quimis; Q318M21). Em paralelo, uma prova em branco (triplicata) do papel de filtro foi levada para calcinação. Uma rampa de aquecimento foi programada da seguinte maneira: 200°C por 1h, 400° por 1h e 800°C por 2h o tempo para cada patamar foi contabilizado a partir do alcance da temperatura estabelecida. O material da mufla foi removido quando a mesma atingiu uma temperatura de 100°C . e pesado após resfriamento da temperatura ambiente em dessecador. A massa de cinzas insolúveis em meio ácido (Mci) foi obtida.

$$Mci(g) = M_{ctc} - (M_c + M_{cp}) \quad (Eq.2.2)$$

Onde:

M_{ctc}: Massa de cinzas total e cadinho

M_c: Massa do cadinho

M_{cp}: Massa de cinzas do papel de filtro (prova em branco)

Com os valores obtidos foi calculada a lignina insolúvel através da Equação 2.3.

$$\text{Lignina Insolúvel (\%)} = \frac{Mk - Mci}{Ma} \times 100 \quad (\text{Eq.2.3})$$

Onde:

Mk: Massa de lignina insolúvel com cinzas

Mci: Massa de cinzas insolúveis em meio ácido

Ma: Massa da amostra

4.3.2.2 Lignina Solúvel

A fração líquida do balão volumétrico mencionado no item 4.3.2 foi analisada para a quantificação de furfural e 5-HMF em HPLC. Desse mesmo balão foi transferida uma alíquota de 5ml para um balão volumétrico de 100ml. A este adicionado 16 gotas de NaOH 6 mol/L . O balão volumétrico de 100ml foi aferido com água e foi verificado o pH na faixa ideal, entre 12 e 14. A absorbância da fração líquida alcalinizada da hidrólise foi medida em 280nm com cubeta de quartzo, no espectrofotômetro (Thermo; Genesys10S UV-Vis).

$$\text{Lignina Solúvel (g/L)} = 4,187 \times 10^{-2} (At - Apd) - 3,279 \times 10^{-4} \quad (\text{Eq.2.4})$$

$$Apd = (c_1 \varepsilon_1 + c_2 \varepsilon_2) - At \quad (\text{Eq.2.5})$$

$$\text{Lignina Solúvel (\%)} = \left(\frac{\frac{\text{Lignina solúvel (g/L)}}{2} \times 100}{Ma} \right) \quad (\text{Eq.2.6})$$

Onde:

At: Absorbância em 280nm

c₁: Concentração de furfural (g/L)

ε₁: Absortividade 146,65 L/g.cm

c₂: Concentração de 5-HMF (g/L)

ε₂: Absortividade 114,00 L/g.cm

Ma: Massa da amostra

4.3.3 Cinzas

Foi pesado 5g da amostra (sem umidade e com extrativos) em cadinho previamente seco e pesado. O conjunto foi levado ao forno mufla a 575°C por 6 horas. O resfriamento do equipamento foi aguardado e a amostra transferida para dessecador. Após resfriamento até temperatura ambiente, a amostra foi pesada.

$$Cinzas (\%) = \frac{M_{cc} - M_c}{M_a} \times 100 \quad (\text{Eq.3.0})$$

Onde:

Mcc: Massa de lignina insolúvel com cinzas

Mci: Massa de cinzas insolúveis em meio ácido

Ma: Massa da amostra

4.3.4 Extrativos Totais

Os extrativos totais foram determinados através da composição de valores obtidos por três extrações: uma com uma mistura de solventes apolares hexano:etanol (1:1) reservando-se o resíduo ao final, outra com solvente polar a quente (água destilada a 95 ± 5°C) e outra com água quente no resíduo reservado dos solventes apolares. Assim se obteve os extrativos totais pela Equação 4.0.

$$ET (\%) = ((E_{he} - E_{ah}) + (E_{aq} - E_{ah}) + E_{ah}) \quad (\text{Eq.4.0})$$

Onde:

Ehe: Extrativos em hexano:etanol 1:1

Eaq: Extrativos em água quente a 95°C ± 5°C

Eah: Extrativos em água quente da amostra sem extrativos solúveis em hexano:etanol (1:1)

O desenvolvimento da Equação 4.0 se deu através da composição química dos extrativos, isto é, alguns de seus compostos são solúveis ou parcialmente

solúveis em ambos solventes. A Figura 33 descreve o esquema adotado. O mesmo não é proporcional, isso significa afirmar que as áreas das figuras não correspondem aos teores obtidos nas análises.

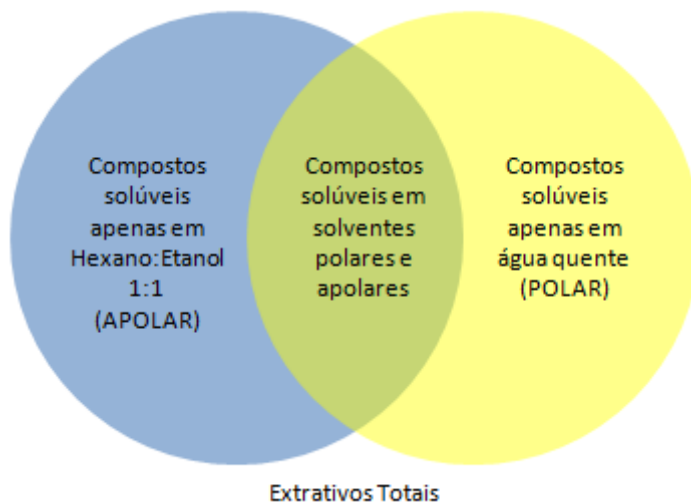


Figura 33 – Esquema de quantificação do teor de extrativos

4.3.4.1 Extrativos em Hexano:Etanol 1:1 (Solvente Apolar)

Com papel de filtro (faixa preta) se montou um cartucho e foi adicionado ao mesmo 5g de amostra (Figura 34). O conjunto foi pesado com o auxílio de um Becker de 100ml, previamente tarado, para apoiá-lo na balança. O cartucho foi posto em equipamento soxhlet (Figura 35) de extração contínua por gotejamento. Ao reboiler foi adicionado 200ml da solução hexano:etanol 1:1. (v/v). A extração ocorreu por 8 horas.



Figura 34 – Montagem do cartucho para a remoção de extrativos

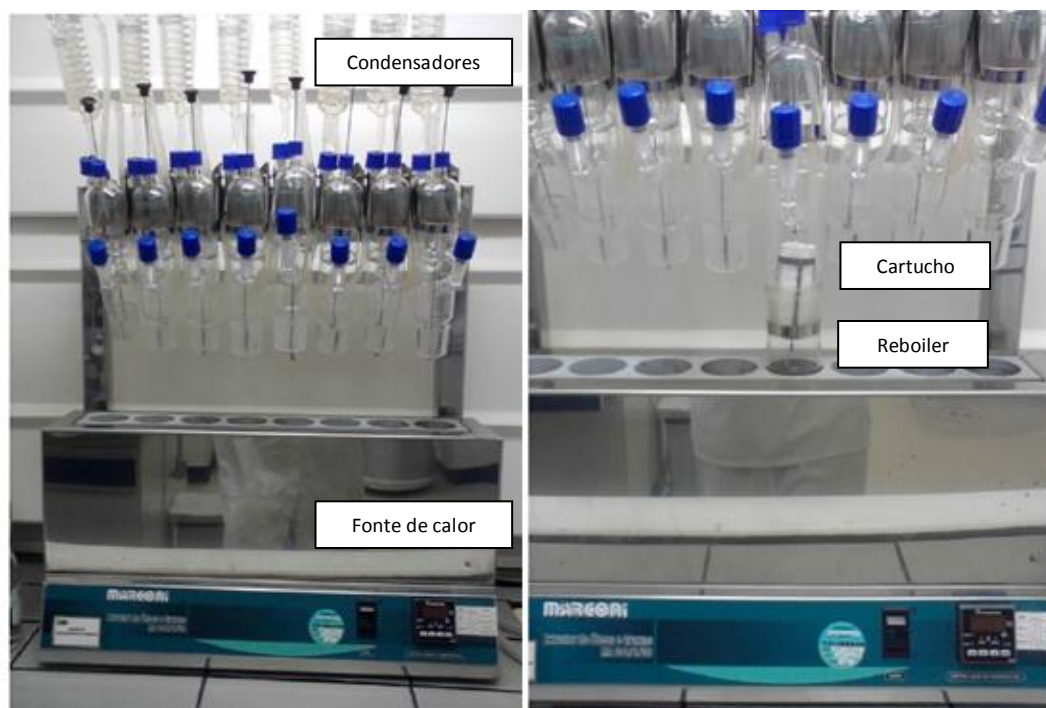


Figura 35 – Equipamento de Soxhlet

Decorrido o tempo, a passagem do solvente proveniente dos condensadores do equipamento foi fechada, se aguardou a evaporação do excesso do solvente no reboiler. O cartucho foi transferido para a estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para total remoção do solvente, resfriada em dessecador e novamente pesada para se obter o teor de extrativos solúveis em hexano:etanol.

$$Ehe (\%) = \frac{(Mcs+Ma)-Mce}{Ma} \times 100 \quad (\text{Eq.4.1})$$

Onde:

Mcs: Massa do cartucho sem extrativos na amostra

Ma: Massa da amostra

Mce: Massa do cartucho com extrativos na amostra

4.3.4.2 Extrativos em Água Quente (Solvente Polar)

Em Erlenmeyer de 250ml, previamente tarado, foi pesado 1g de amostra sem umidade, foi adicionado ao mesmo 100ml de água. O conjunto foi levado para

banho-maria por 3 horas a 100°C. Após o tempo, o conjunto foi removido e filtrado em cadinho de vidro de placa porosa previamente seco e pesado. O resíduo foi lavado com mais 250ml de água destilada quente. Após o escoamento de fase líquida, o cadinho foi seco em estufa a 105°C ± 5°C até peso constante.

$$Eaq (\%) = \frac{(Mcv+Ma)-Mcr}{Ma} \times 100 \quad (\text{Eq.4.2})$$

Onde:

Mcv: Massa do cadinho vazio

Ma: Massa da amostra

Mcr: Massa do cadinho com resíduo

4.3.4.3 Extrativos em Água Quente após Hexano:Etanol 1:1

Foi desenvolvido de forma análoga ao item 4.3.4.2 utilizando o resíduo proveniente da extração do item 4.3.4.1.

4.3.5 Umidade

Foi pesado 5g da amostra com extrativos em cadinho de porcelana seco e previamente pesado. O conjunto foi levado a estufa a 105°C ± 5°C até peso constante.

$$Umidade (\%) = \frac{(Mcv+Ma)-Mcs}{Ma} \times 100 \quad (\text{Eq.5.0})$$

Onde:

Mcv: Massa do cadinho vazio

Ma: Massa da amostra

Mcs: Massa do cadinho com amostra após secagem

O teor de umidade foi determinado logo após a transformação do bambu em cavacos e as outras determinações foram realizadas em base seca, isto é, sem umidade na amostra.

4.3.6 Microscopia Óptica

Através de um microscópio óptico (Motic; BA310), acoplado a uma câmera digital com interface computacional, foi observada a presença ou ausência de grânulos de amido através do gotejamento de uma solução alcoólica de iodo 1% (m/v).

4.3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A biomassa foi analisada em um microscópio eletrônico de varredura (Quanta; 200 FEG) com o intuito de visualizar a morfologia do material, tendo como foco os grânulos de amidos e sua remoção perante os tratamentos submetidos a cada uma das amostras analisadas. As amostras foram recobertas através de metalizador (Bal-Tec; SCD050 Sputter Coater) com um filme de ouro de aproximadamente 10nm de espessura para a melhoria do contraste.

4.3.8 Análise Termogravimétrica (TGA)

Através de um analisador termogravimétrico (Shimadzu; TGA 50) foi obtida a curva de termogravimetria. Pesou-se 4mg da amostra posta em porta-amostra de alumina e foi submetida, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, a um aquecimento de 30° a 900°C com razão de aquecimento de 10°C por minuto.

4.4 SISTEMA DE RECUPERAÇÃO DE FURFURAL E 5-HMF

Para recuperação de componentes de valor comercial e que inibem a fermentação (ver item 3.4.3.1) como furfural e 5-HMF, foi montado um sistema de condensação dos vapores produzidos pelo ensaio de hidrólise ácida que se mostrou de melhor rendimento em ART do item 4.2.2.1.

A partir do reator, mangueiras e conexões foram adaptadas na saída da válvula da qual foram presas por resina epóxi (Figura 36). As mangueiras foram conectadas a um condensador de serpentina em série com um de tubo reto ambos

com água fria em contracorrente. A condução do vapor produzido foi direcionada por um sistema a vácuo produzido por uma bomba (Primastec; 131). O condensado produzido foi recebido em Kitassato de 500ml imerso em banho de gelo. A Figura 34 descreve o sistema de recuperação do furfural e 5-HMF.

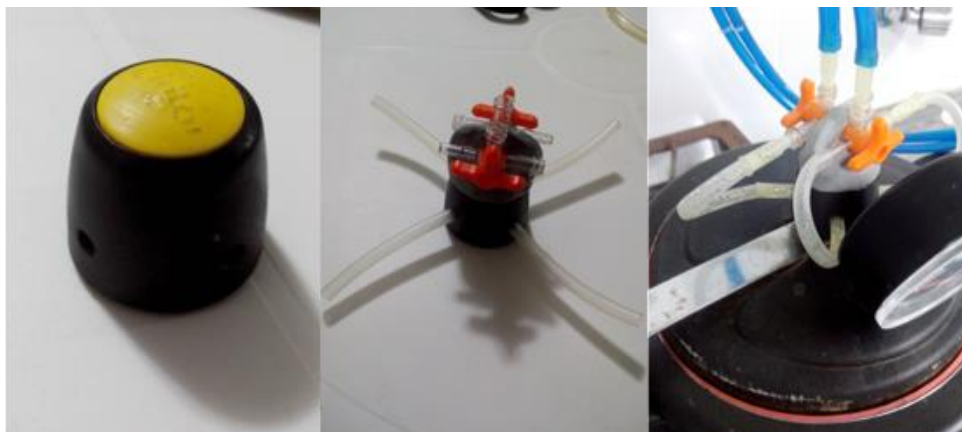


Figura 36 – Montagem da válvula para recuperação de vapor

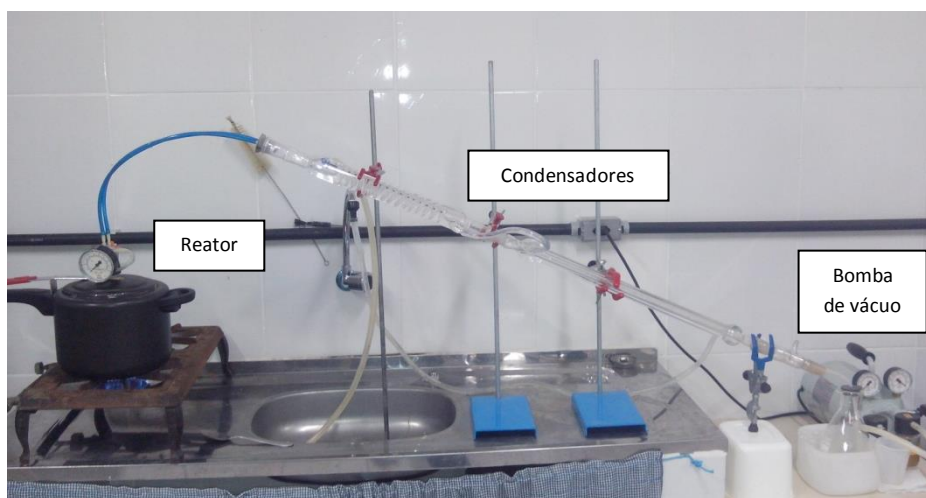


Figura 37 – Sistema de recuperação de furfural e 5-HMF

Após o tempo decorrido, foi medido o volume do extrato hidrolisado e seus teores de furfural e 5-HMF, assim como, o volume de vapor recuperado.

4.5 FERMENTAÇÃO

4.5.1 Preparação do Mosto

O extrato hidrolisado obtido no ensaio de maior rendimento em ART, pelo método de Miller (1959), foi utilizado para o preparo do mosto. Para isso, se elevou o pH para 5,0 com aproximadamente 145ml de uma solução de NaOH 40% (m/v). O mesmo foi filtrado com papel de filtro para balão volumétrico de 2000ml retendo-se o precipitado formado na neutralização. Ao balão foi adicionado os componentes necessários para uma melhor fermentação alcoólica (Tabela 6), exceto K_2HPO_4 , pois, o mesmo precipita-se em presença de açúcares. Com água destilada se aferiu o balão volumétrico e foi agitado até a solubilização dos componentes. O conteúdo foi transferido para um frasco Schott® de 2000 ml e esterilizado por 30 min a 121°C em autoclave. O sal K_2HPO_4 foi esterilizado em mesmas condições em frasco a parte.

Tabela 6 – Nutrientes adicionados aos mostos

Constituintes	Concentração (g/l)
K_2HPO_4	1
Ureia	1
Mg_2SO_4	0,5
Extrato de Levedura	2

Paralelamente, em caráter comparativo, se preparou um mosto com glicose PA (Synth®) como fonte de carbono para a levedura. O meio preparado foi nomeado de 'mosto padrão' e possuía além dos componentes e teores da Tabela 6, concentração de glicose semelhante ao teor de ART do mosto de bambu. O mesmo foi esterilizado com as mesmas condições já descritas.

4.5.2 Processo Fermentativo

O mosto padrão e o mosto de bambu foram fermentados em duplicata em anaerobiose e regime batelada sob agitação por 72h (Figura 38). A agitação ocorreu através de dois agitadores magnéticos (Solab;LS-91) um para cada reator. Os

biorreatores anaeróbios foram montados sobre os agitadores magnéticos, nesses foram postos barras magnéticas de mesmo tamanho e espessura. Foi adicionado o inóculo de 3 g/L de *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada da marca Fleischmann® lote 231/16 aos meios a serem fermentados.

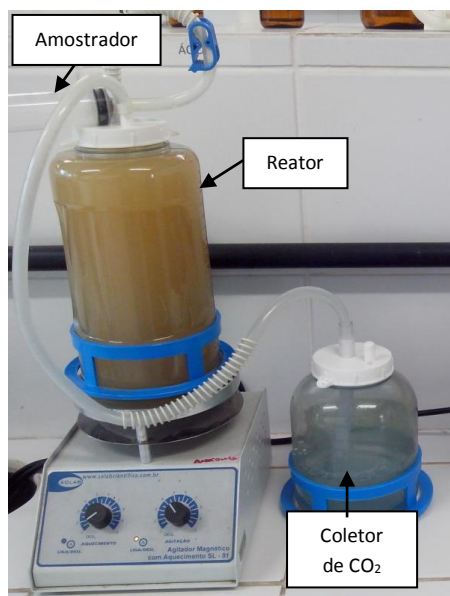


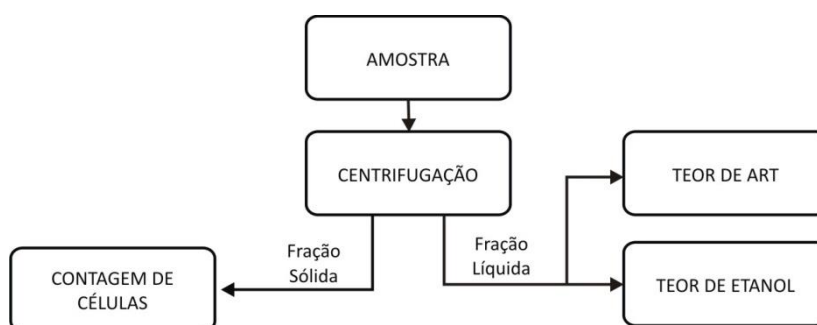
Figura 38 – Sistema de fermentação anaeróbia adotado

Aproximadamente 20 ml das amostras foram coletadas seguindo o regime descritos no Quadro 4 em tubos tipo falcon de 50ml. O material coletado foi centrifugado por 20 minutos em 2500 RPM em centrífuga (Fanem; Excelsa II).

A figura 39 mostra o fluxograma que a fase líquida e a fase sólida foram submetidas. A líquida foi transferida para outro recipiente onde se quantificou o teor de ART por Miller (1959) e etanol por cromatografia gasosa com cromatógrafo CG Master com detector de ionização de chama, fase móvel hidrogênio, coluna Carbowax 20M, temperaturas de vaporização, coluna e detector de 150°C, 45°C e 200°C respectivamente. A sólida foi adicionada, ainda no tubo, o volume de aproximadamente 20ml de água destilada na qual foi ressuspensa em agitador de tubos tipo vórtex (Nova; NI1055) e foi transferido, imediatamente, 1 ml da ressuspensão para tubo de ensaio e foi adicionado ao mesmo 1ml de solução de azul de metileno 1%(m/v) e citrato de sódio 2% (m/v), foi agitada no vórtex e se aguardou 15 min para a leitura na Câmara de Neubauer em microscópio óptico (Motic; BA310).

Quadro 4 – Regime de coleta na fermentação

Coleta	Tempo após início da fermentação (h)	Coleta	Tempo após início da fermentação (h)
T0	0	T5	24
T1	3	T6	30
T2	6	T7	48
T3	9	T8	60
T4	12	T9	72

**Figura 39 – Fluxograma do tratamento da coleta da fermentação**

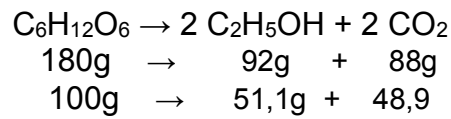
A viabilidade celular foi determinada através da Câmara de Neubauer, considerando que as células de leveduras inviáveis (mortas) colorem em azul pela inativação das suas enzimas redutoras e as viáveis (vivas) permanecem sem coloração. A câmara foi lida cruzando as diagonais dos quadrantes que passam no centro da grade desprezando as células que tocam na aresta superior e direita de cada um deles. O volume contido na área analisada é de 0,04 mm³.

A concentração celular (g/l) foi determinada multiplicando a quantidade de células vivas encontradas na câmara de Neubauer pela massa aproximada de uma célula. O peso da célula foi estimado segundo o fabricante de fermento Lallemand® que afirma que o fermento da especificação utilizado nos experimentos contém em 1g (peso seco) 5 bilhões de células, cujo valor foi utilizado para os devidos cálculos.

4.5.3 Parâmetros Cinéticos

O rendimento teórico e rendimento prático das fermentações foram calculados a partir da equação proposta por Gay-Lussac (conversão de 51,1% em etanol) e a prática obtida pelo mosto padrão (ver item 4.5.1) em relação a fermentação do mosto de bambu.

Transformação química:



O perfil cinético de crescimento da levedura foram ajustados a partir do modelo logístico de crescimento mostrado na Equação 6.0 para os meios fermentados. As equações foram integradas considerando o tempo inicial igual a zero. Foi adotado o modelo de velocidade específica de crescimento celular segundo Monod (1949) (Equação 6.1) e o tempo de duplicação da população da levedura foi calculado através da Equação 6.2 denominado tempo de geração (g).

$$\int_{x_0}^{x_i} \frac{dX}{X} = \mu \int_{t_0}^{t_i} dt \Rightarrow \frac{dX}{dt} = \mu X \quad (\text{Eq.6.0})$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_M + S} \quad (\text{Eq.6.1})$$

$$g = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (\text{Eq.6.2})$$

Onde:

μ : Velocidade específica de crescimento celular (g/g.h)

X : Concentração de células (g/L)

T : Tempo (h)

μ_{\max} : Velocidade específica máxima de crescimento celular (g/g h)

S : Concentração do substrato (g/L)

K_M : Constante de Saturação (g/L)

g : Tempo de geração (h)

Os fatores de conversão estequiométricos foram determinados através das equações 6.3 e 6.4 descritas por Sinclair e Kristiansen (1987).

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (\text{Eq.6.3})$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (\text{Eq.6.4})$$

Onde:

$Y_{X/S}$: Fator de conversão de substrato em células (g/g)

$Y_{P/S}$: Fator de conversão de substrato em produto (g/g)

As condições do estudo foram validadas ao modelo de Luedeking e Piret (1959) para a formação de produto descrito na Equação 6.6.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (\text{Eq.6.6})$$

Os coeficientes α e β são funções das concentrações de produto e substrato. A cinética de formação podem ser descritas pelo Quadro 5 e Figura 40.

Quadro 5 – Representação de α e β para o modelo Luedeking e Piret (1959)

Coefficientes	Representação	Legenda do gráfico
$\alpha \neq 0$ e $\beta = 0$	Produto formado durante o crescimento, sendo proporcional a velocidade de crescimento. Produção associada ao crescimento.	1
$\alpha \neq 0$ e $\beta \neq 0$	Produto formado parte antes e parte depois do crescimento. Produção parcialmente associada ao crescimento (misto)	2
$\alpha = 0$ e $\beta \neq 0$	Produto formado somente após o crescimento. Produção não associada ao crescimento.	3

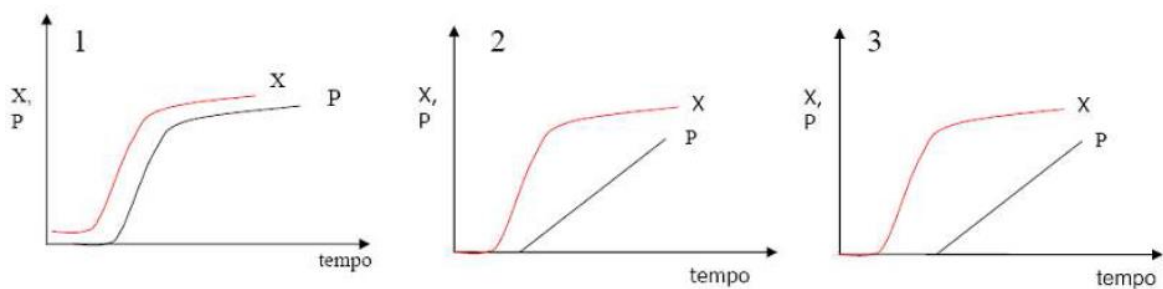


Figura 40 – Gráficos que representam o modelo de Luedeking e Piret (1959)

Fonte: PEREIRA, 2016

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 REMOÇÃO DO AMIDO

Os resultados a seguir mostram os teores de amido removido da biomassa vegetal do bambu de forma direta por dois métodos utilizando água quente ($95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) e de forma indireta utilizando a hidrólise ácida.

5.1.1 Pré-Avaliação na Decocção do Bambu em Sistema Aberto

Pela pré-avaliação foi observado que a espécie de bambu analisada continha amido em sua composição (Figura 41), isto porque quando foi adicionada a solução alcoólica de iodo a 1% (m/v) houve o aparecimento da coloração azul indicando a presença do carboidrato dissolvido na água (solvente) utilizada na extração.



Figura 41 – Teste do iodo realizado em uma extração com água contendo amido

Foi possível observar que a extração por esse processo se mostrou com baixa eficiência devido a quantidade de amido extraída da biomassa vegetal (Tabela 7) ou até que os colmos analisados poderiam ter teores bem reduzidos desse carboidrato.

Tabela 7 – Teor de amido removido por extração com água quente sem pressão

Amostra	Número de extrações até a não detecção do iodo a 1%(m/v)	Volume de água utilizado Total (L)	Percentual médio do teor de amido removido no bambu seco (% m/m)	Desvio Padrão
Extração sem pressão	3	2,9	2,475	0,116

Através dos valores obtidos no método adotado foi possível observar que o amido encontrado no colmo do bambu é de difícil extração apenas com água e temperatura ($95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) e que o teor se mostrou com valores abaixo dos citados por Azzini (1984) que variaram entre 3,38% a 45%, portanto, novos métodos para melhores rendimentos foram exigidos na pesquisa.

5.1.2 Decocção do Bambu em Sistema Semiaberto Sob Pressão

Com o acréscimo da pressão de 1 kgf/cm^2 , o desfibramento e a proporção 1:30 (66,65g de bambu e 2000ml de água como solvente), o teor extraído de amido foi elevado. Fato esse pode ser provavelmente atrelado ao acréscimo de 26°C de temperatura no processo (proveniente do aumento da pressão) e consequentemente maior solubilização do amido no meio, que segundo Pedrenho *et al.* (2008) temperaturas próximas a 120°C tem capacidade de favorecer o desenovelamento da amilose e, consequentemente, sua solubilidade. A pressão de 1 kgf/cm^2 submetida ao processo também poderia de alguma forma romper algumas células de parênquimas liberando o amido ao solvente, elevando esse rendimento em relação ao método do item 5.1.1, porém, o desfibramento provavelmente contribuiu majoritariamente para esse fenômeno segundo observações realizadas por Azzini e Gondim-Tomaz (1996). Entretanto, a quantidade de água (solvente) utilizada para essa extração foi substancialmente maior que a utilizada no item 5.1.1 seguindo a proporção considerada ótima descrita por Azzini e Arruda (1986).

Diferentemente do item anterior, o teste com iodo se perdurou por várias extrações (Figura 42), corroborando que o aumento na extração do amido possivelmente pode está relacionada a uma ou a sinergia das alterações envolvidas como o desfibramento, proporção biomassa:solvente (1:30), aumento da temperatura e pressão.

Com os teores de amido quantificados em cada extração, um gráfico foi traçado para demonstração do decaimento do mesmo na biomassa vegetal (Figura

43). O gráfico demonstra também que 50,68% do total do amido foi extraído já na primeira decocção e que, 84,46% até a décima extração. O restante dos 15,54% de amido removido da matriz necessitou de mais 16 extrações, isso pode ser devido a disponibilidade do carboidrato na amostra, como também, ao aumento da cristalinidade que, segundo Hoover (2001) e Singh *et al.* (2003), devido ao número de aquecimentos e resfriamentos os grânulos de amido podem aumentar sua resistência a gelatinização e consequentemente a solubilização.

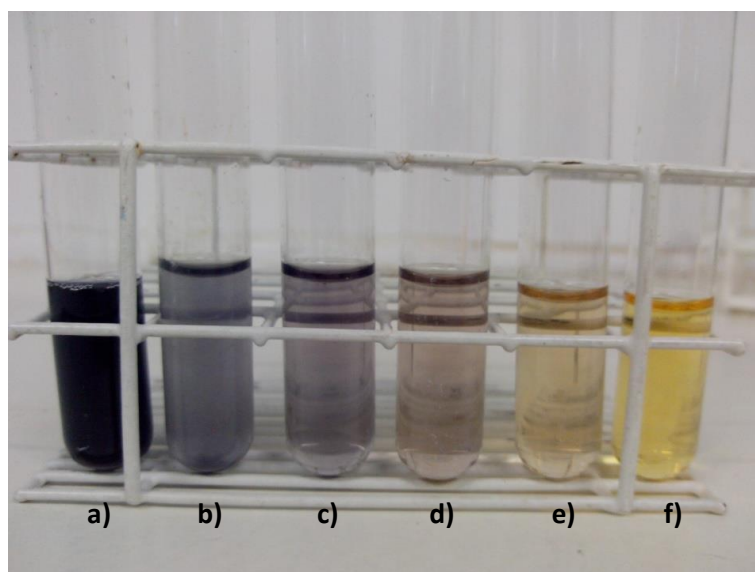


Figura 42 – Aspecto do teste quantitativo de amido por Figueira e Hirooka (2000) nas extrações: a) 1ª; b) 6ª; c) 10ª; d) 14ª; e) 21ª e f) 26ª extração

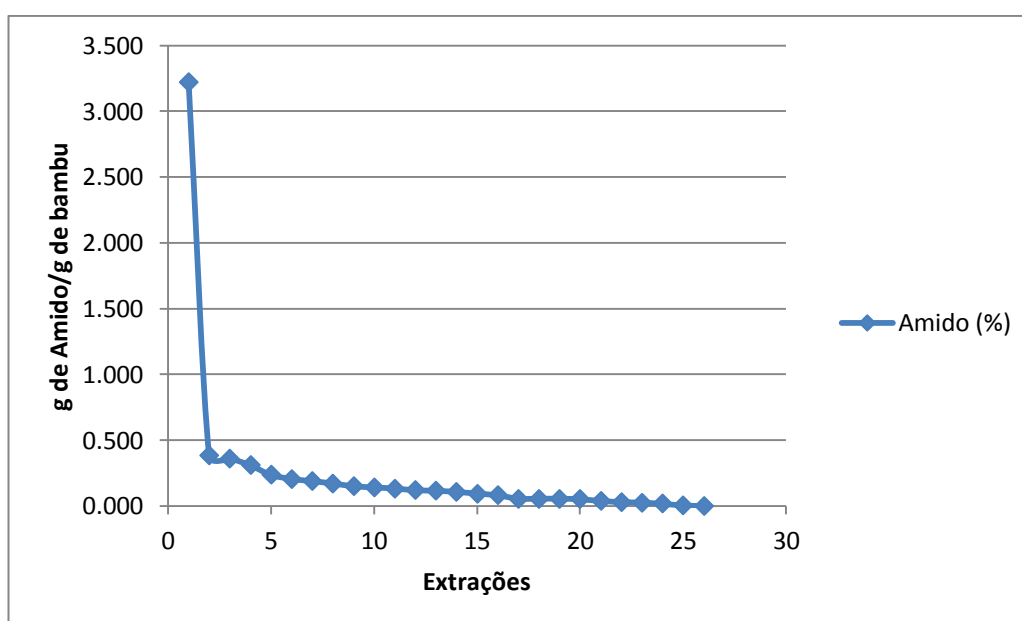


Figura 43 – Percentual (g/g) do teor de amido removido ao longo das extrações

Segundo Azzini (1984), os valores de amido no colmo do bambu podem variar segundo a espécie analisada como também o método de quantificação. Os resultados encontrados (Tabela 8) possuem valores muito próximos aos encontrados por Hino (1961) 3,28% a 9,40%, porém, muito abaixo do encontrado por Menezes e Azzini (1981) 30% a 45%.

Tabela 8 – Teor de amido removido por extração com água quente e pressão de 1 kgf/cm²

Amostra	Número de extrações até a não detecção do iodo a 1%	Volume de água utilizado Total (L)	Teor de amido total removido no bambu seco (% g/g)	Aumento em relação ao amido removido sem pressão (%)
Extração com pressão	26	52	6,355	61,05

Tanto as metodologias quanto as espécies utilizadas pelos autores Hino (1961) e Menezes e Azzini (1981) foram distintas em relação a esse experimento. A quantificação do amido utilizada pelos mesmos se deu pela forma indireta, isto é, submeteram a biomassa a um processo de sacarificação por hidrólise e pelo teor obtido de glicose, ou açúcares redutores, o teor de amido inicial foi determinado. Os mesmos pressupõe que os açúcares gerados foram provenientes apenas do amido contido no colmo.

5.1.3 Extração e Sacarificação por Hidrólise Ácida

Após a hidrólise ácida a fração fibrosa sofreu um leve escurecimento (Figura 44) fato também constatado por Azzini *et al.* (1987a).



Figura 44 – Biomassa vegetal a) antes e b) após a hidrólise ácida

A fração líquida obtida (Figura 45) possuía uma coloração marrom, com leve espuma e odor semelhante ao caldo de cana-de-açúcar. A espuma provavelmente foi formada devido a presença de saponinas na composição dos extrativos do vegetal. A coloração e o odor característicos, por sua vez, podem ser provenientes da reação de Maillard (1912) e dos açúcares contido no extrato, respectivamente.



Figura 45 – Fração líquida (extrato) obtida após a hidrólise ácida no bambu

Os resultados dos açúcares redutores totais (ART) obtidos na fração líquida provenientes das hidrolises do amido estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados do fatorial 2³ dos teores de açúcares redutores totais

Experimento	Tempo (min)	Concentração de H ₂ SO ₄ (% v/v)	Forma	Teor médio de ART (g/L)	Desvio Padrão
1	50	1	Pó	12,62	1,73
2	100	1	Pó	12,43	0,82
3	50	2	Pó	15,43	0,39
4	100	2	Pó	14,58	0,69
5	50	1	Cavaco	14,94	1,51
6	100	1	Cavaco	15,45	0,01
7	50	2	Cavaco	15,42	0,32
8	100	2	Cavaco	16,18	0,94

Os valores foram tratados com ANOVA, para isso precisou-se separar os valores de ART por variáveis como mostrado na Tabela 10, 11 e 12. O número entre parênteses nessas tabelas é correspondente ao experimento descrito na primeira coluna da Tabela 9.

Tabela 10 – Resultados de ART em relação ao Tempo para o ANOVA

Tempo (min)	Teor de ART em g/L (Experimento)			
50	12,62 (1)	15,43 (3)	14,58 (5)	15,42 (7)
100	12,43 (2)	14,58 (4)	15,45 (6)	16,18 (8)

Tabela 11 – Resultados de ART em relação à Concentração da Solução de H₂SO₄ para o ANOVA

Concentração da Solução de H ₂ SO ₄ (% v/v)	Teor de ART em g/L (Experimento)			
1	12,62 (1)	12,43 (2)	14,94 (5)	15,45 (6)
2	15,43 (3)	14,58 (4)	15,42 (7)	16,18 (8)

Tabela 12 – Resultados de ART em relação à Forma para o ANOVA

Forma	Teor de ART em g/L (Experimento)			
Pó	12,62 (1)	12,43 (2)	15,43 (3)	14,58 (4)
Cavaco	14,94 (5)	15,45 (6)	15,42 (7)	16,18 (8)

Tabela 13 – Teste de variância ANOVA aplicado

Variável	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Valor de F calculado	Valor de F tabelado	Diferença encontrada entre os níveis	Diferença significativa (*) entre os níveis
Tempo	9,47	6	44,80	234	0,06	>2,17
Concentração	9,39	6	3,89	5,987	1,54	>1,69
Forma	10,76	6	2,96	5,987	1,73	>1,90

* estatisticamente significativa no nível de confiança de 95% (tabela T)

Com os testes realizados pelo ANOVA foi notado que nenhuma das variáveis aplicadas altera estatisticamente a variável de resposta o teor de açúcares redutores totais (ART) como mostrado na Tabela 13, isto é, não há diferença significativa entre os valores obtidos independente do tratamento escolhido.

Contudo, foi adotada uma nova estratégia para novos testes. Objetivando a economia do processo no âmbito energético; o menor tempo e o material menos processado foram escolhidos, então, um novo experimento foi executado com mais 8 (oito) testes composto por duas quadruplicatas variando-se apenas a concentração do ácido (Tabela 14) e adotando o tempo de 50 minutos e a forma de cavaco.

Tabela 14 – Ensaios realizados variando-se a Concentração da Solução de H_2SO_4

Concentração da Solução de H_2SO_4 (% v/v)	Teor de ART em g/L (Experimento)			
0,5	7,44 (9)	7,76 (10)	8,07 (11)	8,05 (12)
5,0	13,85 (13)	13,38 (14)	13,36 (15)	13,80 (16)

Foram agrupados os valores da Tabela 14 com os da Tabela 11 e foi aplicado novamente o ANOVA e uma nova resposta foi obtida mostrada na Tabela 15.

Tabela 15 – Teste de variância ANOVA aplicado aos valores agrupados

Variável	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Valor de F calculado	Valor de F tabelado	Diferença significativa (*) entre as concentrações
Concentração de H_2SO_4	141,70	12	58,77	3,49	>1,3

* estatisticamente significativa no nível de confiança de 95% (tabela T)

Tabela 16 – Ordem de eficiência das soluções ácidas nas obtenções de ART

Concentração de H_2SO_4 (% v/v)	Teor médio de ART	Ordem da eficiência da hidrólise
0,5	7,83	4
1,0	13,86	2
2,0	15,40	1
5,0	13,60	3

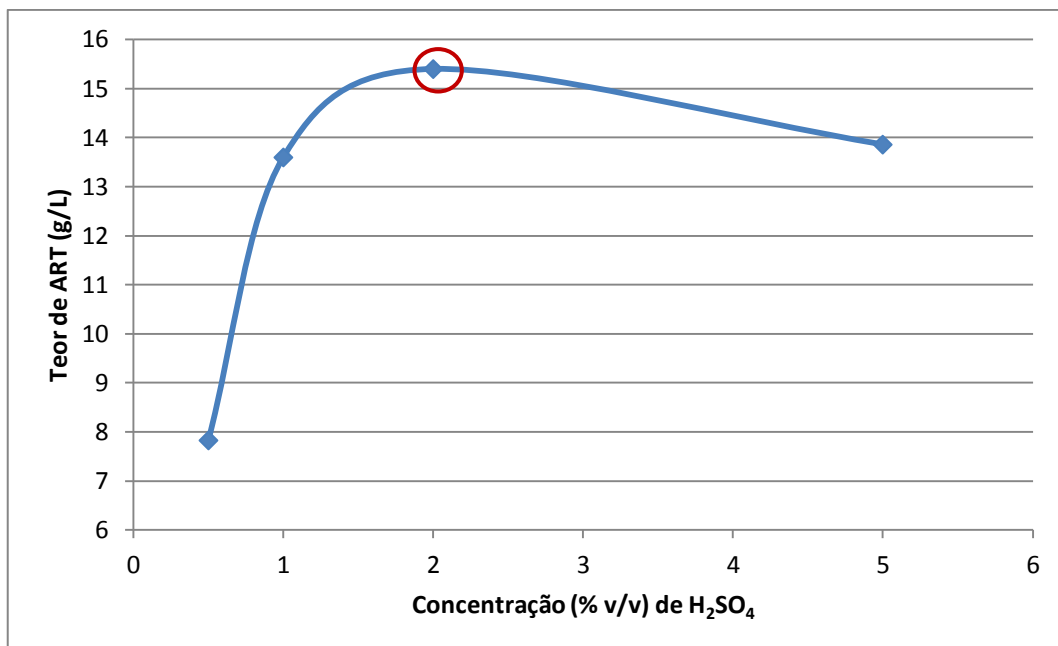


Figura 46 – Gráfico com identificação do ponto ótimo da hidrólise

A Tabela 16 e a Figura 46 mostram que com os valores agrupados no teste de variância, o tratamento com o ácido sulfúrico a 2,0% v/v se mostra o mais eficiente para obtenção de açúcares redutores totais perante aos demais. Entretanto, não há diferenças significativas entre as concentrações 1,0% v/v e 5,0% v/v. Provavelmente, a solução ácida a 1,0% v/v, nas condições aplicadas, não consegue hidrolisar todo material envolvido, enquanto a de 5,0% v/v, por ser um meio quimicamente mais severo, tende a produzir, segundo Palmqvist e Hahn-Hagerdal (2000) *apud* Barcelos (2012), subprodutos de degradação de carboidratos como xilose e glicose em furfural e 5-HMF respectivamente, reduzindo assim o teor de ART.

O ponto ótimo encontrado está de acordo com os estudos de Azzini e Arruda (1986) que encontraram o melhor rendimento em açúcares redutores com a mesma concentração de 2% v/v de ácido sulfúrico e tempo de 60 minutos muito próximo ao que foi estudado (50 minutos), porém não utilizaram pressão no sistema. Foi considerada a Equação 6.0 descrita por Azzini e Arruda (1986) para a quantificação do teor de amido no colmo do bambu. Os resultados encontrados mostraram-se bem distintos dos encontrados nas extrações com água no bambu de forma direta (Tabela 7 e Tabela 8).

$$\text{Amido no Bambu (\%)} = (Gh - Gl) \times 0,9 \quad (\text{Eq.6.0})$$

Onde:

Gh: Rendimento em glicose proveniente da sacarificação do amido, expresso em porcentagem (base seca)

Gl: Teor de glicose na serragem de bambu, expresso em porcentagem (base seca);

0,9: Fator de conversão de amido para glicose

Para aplicação da Equação 6.0 o teor de glicose livre no bambu foi mensurado. Para isso, o ácido envolvido foi trocado por água destilada e os demais parâmetros no ponto ótimo foram obedecidos. O teor médio de glicose livre encontrado foi $2,44 \pm 0,14\text{g}$ em 66,6g de bambu. Então, segundo a Equação 6.0 o teor de amido no bambu analisado em base seca foi de 38,32%.

Esse resultado entra em consonância com os encontrados por Azzini *et al.* (1979) pois determinaram teores de 29,66% a 41,07% de amido para a mesma espécie de bambu pesquisada neste trabalho, como também com Menezes e Azzini (1981) que obtiveram 30% a 45% na espécie *Guadua flabellata*. Porém, pelo método adotado, não há garantias que os açúcares foram proveniente apenas do amido, por conta disso, a biomassa vegetal resultante do procedimento de hidrólise também foi caracterizada para comparação com a amostra *in natura*.

5.1.4 Hidrólise em Sistema Fechado no Ponto Ótimo (Eficiência do *Flash*)

Através dos resultados dos experimentos realizados em sistema semiaberto (com *flash*) descritos no item 5.1.3, que mostram que a concentração de ácido sulfúrico a 2% (v/v), o tempo de 50 minutos e a forma de cavacos é a condição de ponto ótimo do processo na produção de ART, foi analisado no extrato obtido, além da concentração de ART, os teores de furfural e 5-HMF. Em caráter comparativo, também foi mensurado esses teores em um sistema em regime fechado (sem *flash*) em frascos Schott® com as condições ótimas de processo em relação a concentração de ácido, tempo e forma e foram comparados com os valores.

Perante os resultados da Tabela 17, foi validado que o sistema de *flash* se mostrou satisfatório para redução dos subprodutos da hidrólise. A redução foi maior de 5-HMF em 22,73% em relação ao furfural, possivelmente por conta do ponto de

ebulição do 5-HMF (115°C) ser menor do que o do furfural (162°C) e da temperatura do meio reacional (121°C), sendo assim mais fácil arrasta-lo junto ao vapor d'água.

Tabela 17 – Teores de furfural e 5-HMF em sistema com e sem *flash*

	Fechado (sem <i>flash</i>)	Desvio	Semiaberto (com <i>flash</i>)	Desvio	Redução do componente no extrato com a aplicação do <i>flash</i> (%)
Furfural (g/l)	0,100	0,002	0,064	0,004	36,00
5-HMF (g/l)	0,088	0,003	0,047	0,004	46,59

Com os resultados mostrados na Tabela 17 também se pode constatar que parte da xilose e glicose foram convertidas a seus subprodutos correspondentes: furfural e 5-HMF, fenômeno constatado por Mussato e Roberto (2004). Vale salientar que, com esses resultados, se pode prever que houve ataque não somente ao amido produzindo glicose como também a hemicelulose obtendo-se xilose.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

5.2.1 Composição

A Tabela 18 mostra os valores obtidos na caracterização das biomassas vegetais consideradas relevantes para o estudo. Através dela se pode constatar que os valores percentuais encontrados na amostra *in natura* estão aproximadamente de acordo com os encontrados por Foelkel e Klein (2012) mostrados na Tabela 2, exceto a celulose e os extrativos em hexano:etanol. O teor de celulose foi um pouco abaixo, isso pode está ligado ao fato dos colmos trabalhados na pesquisa serem no máximo de 1 (uma) polegada de diâmetro, sendo para espécie avaliada, relativamente novos em comparação ao tamanho máximo que o colmo pode alcançar (4 polegadas), como também, local de plantio, tipo de solo e cultivo. O teor de extrativos hexano:etanol, além da possibilidade idêntica ao da celulose pode também está vinculado a mistura de solventes escolhida, que, por sua vez, foi diferente em relação aos autores que escolheram etanol:tolueno.

Tabela 18 – Teores em percentual da composição das biomassas vegetais analisadas

Parâmetro (%)	In Natura	Desvio	Trat. Ótimo ¹	Desvio	Trat. Severo ²	Desvio	SSA sob Pressão ³	Desvio
Celulose	31,05	1,01	31,34	0,86	29,51	1,02	26,17	0,95
Hemicelulose	22,39	0,01	1,03	0,01	0,66	0,01	32,22	0,05
Lignina Total	21,64	0,85	22,6	0,75	22,57	0,16	21,60	0,77
Cinzas	2,45	0,03	1,04	0,21	1,47	0,11	0,87	0,02
Extrativos Totais	22,03	1,00	16,96	0,64	11,26	0,34	6,72	0,17
Extrativos H:E ⁴	12,13	-	10,25	-	6,77	-	4,61	-
Extrativos AQ ⁵	18,3	-	8,65	-	6,48	-	5,02	-
Extrativos (AQ após H:E)	8,4	-	1,94	-	1,99	-	2,91	-
Umidade	38,19	1,18	-	-	-	-	-	-
Soma b.s.⁶	99,56	0,58	72,97	0,49	65,47	0,33	87,58	0,39

(1) Tratamento c/ 2% de H₂SO₄; 50 min; cavacos; (2) Tratamento c/ 5% de H₂SO₄; 50 min; cavacos; (3) Biomassa proveniente da remoção do amido no Sistema Semiaberto sob Pressão; (4) Hexano:Etanol 1:1 (5) Água Quente 95°C±5°C (6) Soma dos compostos em base seca: Celulose, Hemicelulose, Lignina Total, Cinzas e Extrativos Totais

O teor de umidade ficou pouco acima do esperado, porém, este parâmetro possui muitas variáveis que podem ser vinculada principalmente a estação climática do ano que foi coletada e ao clima da região onde a espécie está localizada.

Foi observado que a hidrólise ácida, tanto no ponto ótimo quanto no meio mais severo, não só apenas hidrolisam o amido, que estão no grupo de substâncias solúveis em água quente, como também, a hemicelulose, mas não atacam a celulose. É desejável a degradação da hemicelulose, visto que, para a indústria de celulose, segundo Castro (2009), as substâncias que a compõe são interferentes no processo e também são eliminadas, apenas, em alguns casos, se utiliza um percentual mínimo de hemicelulose para alguns tipos específicos de papel e para hidratação da pasta celulósica.

A Equação 6.0, descrita por Azzini e Arruda (1986) (item 5.1.3), considera que o teor de açúcares redutores totais é igual ao de glicose, e, que todo esse carboidrato é proveniente apenas do desdobramento do amido contido no colmo do bambu. Porém, através dos resultados mostrados na Tabela 18, ao final da reação de hidrólise ácida, se confirmou que também outros açúcares redutores

provavelmente são formados a partir do ataque a hemicelulose como xilose e arabinose, portanto, a equação citada apenas garante um teor aproximado de amido existente no vegetal.

Outro ponto relevante é que, no tratamento mais severo, mesmo com a maior hidrólise da hemicelulose e dos extrativos em água quente tais como o amido, não se elevou o rendimento em açúcares redutores, corroborando que esta concentração de ácido possivelmente degrada os açúcares antes formados em subprodutos indesejáveis como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural. Mesmo após as hidrólises, as biomassas vegetais resultantes ainda continham materiais hidrossolúveis possivelmente compostas de açúcares de menor tamanho que o amido ou outros resíduos da reação com ácido.

A remoção do amido no sistema semiaberto sob pressão de 1kgf/cm² mostra-se mais uma vez com baixa eficiência, pois, mesmo após 26 extrações, a biomassa vegetal ainda continha materiais hidrossolúveis que possivelmente é amido, pois, o mesmo é responsável por praticamente toda a fração de extrativos hidrossolúveis do bambu. A redução de celulose e o aumento da hemicelulose desse processo podem está ligados entre si, pois, por seguidas hidratações sob calor e pressão, podem ocasionar um aumento na fragilidade das partes amorfas da celulose que, segundo Castro (2009), essa região amorfa determina a absorção de água no polímero de celulose e, por consequência, provavelmente se tornou mais susceptíveis ao ataque dos reagentes utilizados na determinação de hemicelulose.

5.2.2 Microscopia Óptica

Na microscopia óptica observou a presença ou ausência de amido através da reação com iodo. A presença do carboidrato foi indicada por estruturas esféricas com colocação escura na presença de uma solução de iodo (Figura 47).

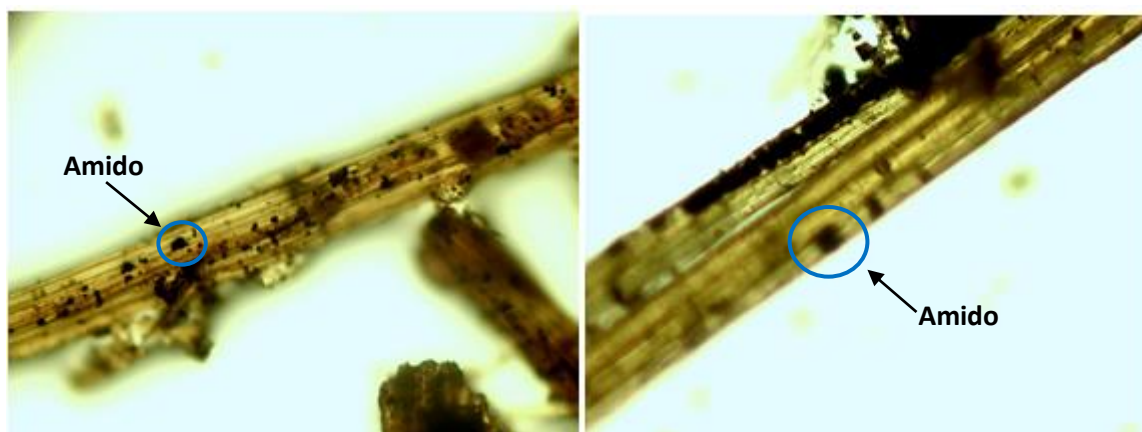


Figura 47 – Fibras ampliadas (100x) do bambu *in natura* com contraste de iodo a 1% (v/v)

Para ambos tratamentos com soluções ácidas, 2% e 5% de H_2SO_4 (v/v), foi percebido praticamente a total ausência de amido nas fibras (Figuras 48 e 49), porém, no tratamento mais severo (5% de ácido) as fibras ficaram enegrecidas e não aumentam o rendimento de açúcares redutores na fração líquida da hidrólise.

As fibras provenientes da remoção do amido no sistema semiaberto sob pressão de 1 kgf/cm^2 (Figura 50) apresentaram amido mesmo após várias extrações, se confirmou os resultados obtidos na Tabela 18 que mostram que a biomassa resultante desse tratamento possui extrativos hidrossolúveis. Foi observado também que as fibras aparentavam desgaste possivelmente devido as extrações seriadas.

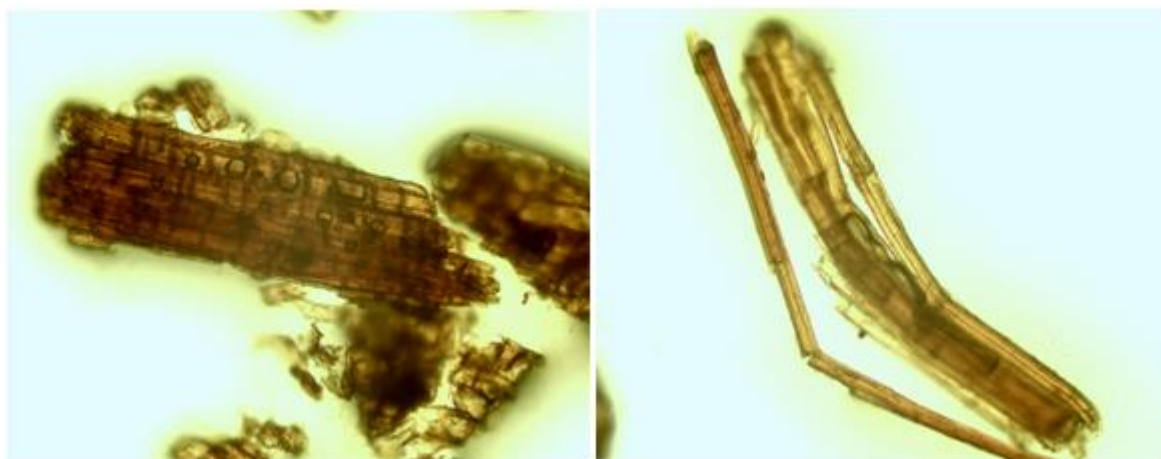


Figura 48 – Fibras ampliadas (100x) do bambu tratadas com solução de H_2SO_4 2% (v/v)

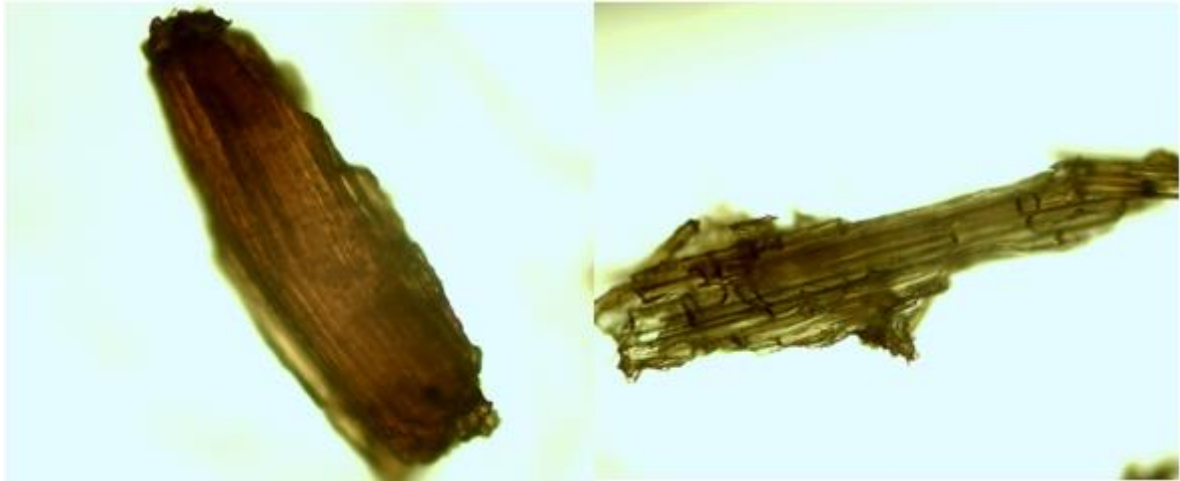


Figura 49 – Fibras ampliadas (100x) do bambu tratadas com solução de H_2SO_4 5% v/v

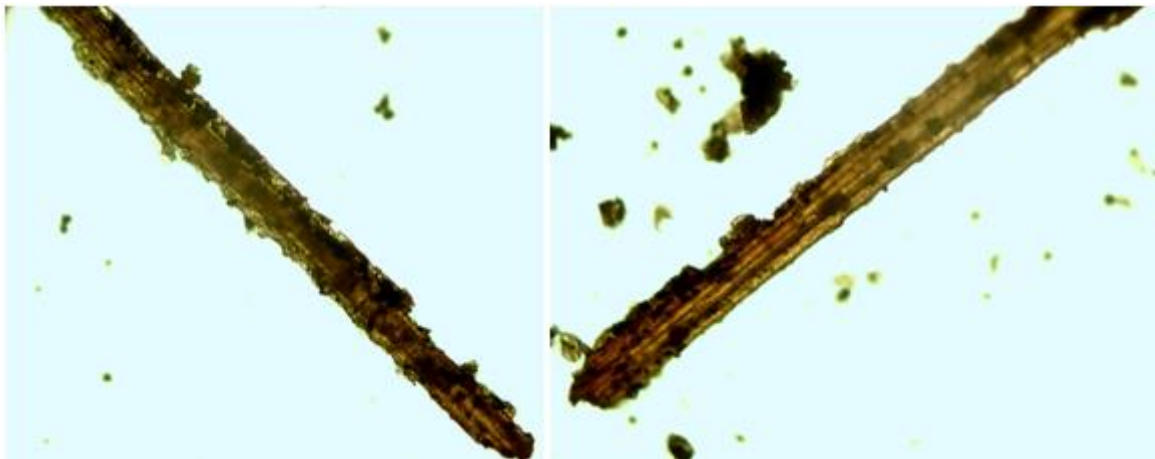


Figura 50 – Fibras ampliadas (100x) do bambu após a 26ª extração para a remoção do amido no sistema semiaberto sob pressão

5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com a microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar o grânulo do amido e algumas estruturas da morfologia do bambu muito semelhante ao mostrado na Figura 17 por Liese (1998) devido a capacidade de ampliação do equipamento. Os mesmos foram observados nas estruturas parenquimáticas da biomassa do bambu *in natura* (Figura 51), como também a sua remoção nas hidrólises ácidas (Figuras 52 e 53).

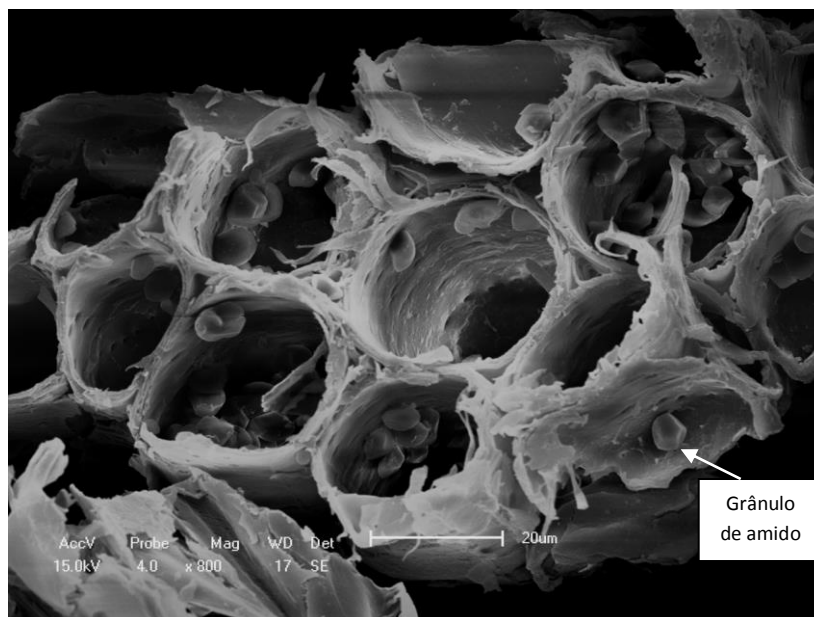


Figura 51 – Células de parênquimas da amostra *in natura* com a presença de grânulos de amido

Assim como na microscopia óptica, foi observado que as hidrólises ácidas conseguem remover de forma satisfatória praticamente todo o amido contido nas células de parênquimas do bambu como mostrado nas Figuras 52 e 53 em relação a Figura 51.

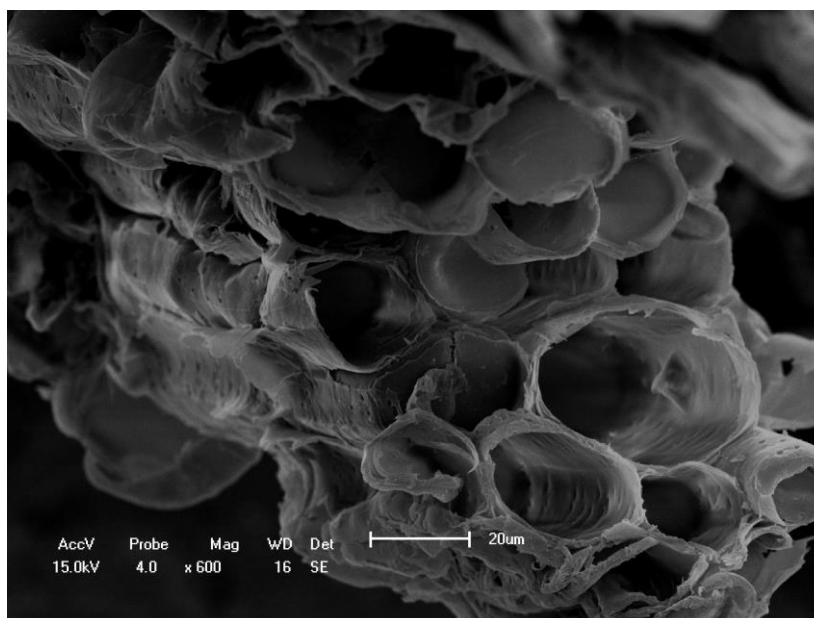


Figura 52 – Células de parênquimas da amostra tratada com solução de H₂SO₄ 2% (v/v)

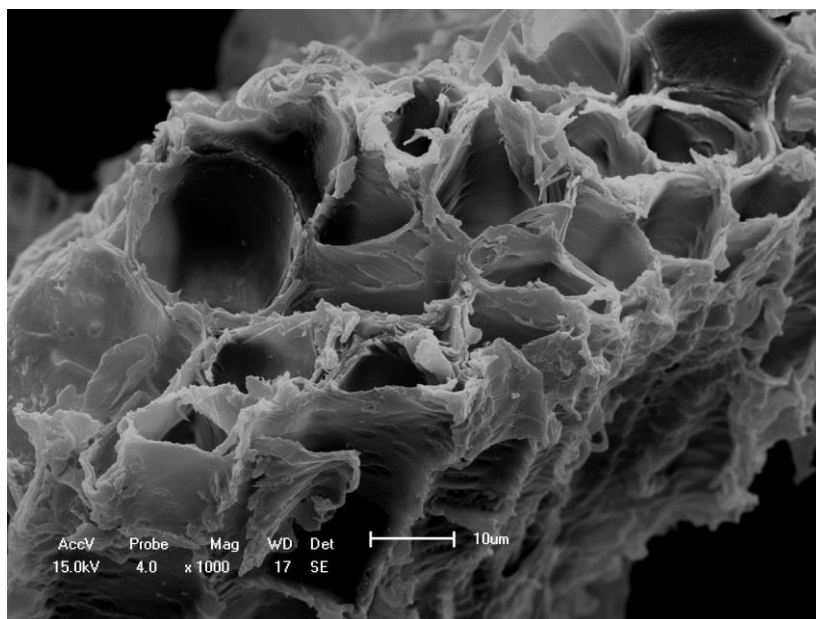


Figura 53 – Células de parênquimas da amostra tratada com solução de H₂SO₄ 5% v/v

Foi evidenciado que houve rupturas na biomassa em todos os tratamentos hidrotérmicos (com água a 121°C) aplicados, sendo mais evidente na amostra da Figura 54 provavelmente por conta das sucessivas extrações, também foi notado com mais nitidez o alargamento das microcicatrizas onde se fixam os grânulos de amido quando estão presos na estrutura do vegetal, através da Figura 54 foi observada também a porosidade da morfologia estrutural do bambu.

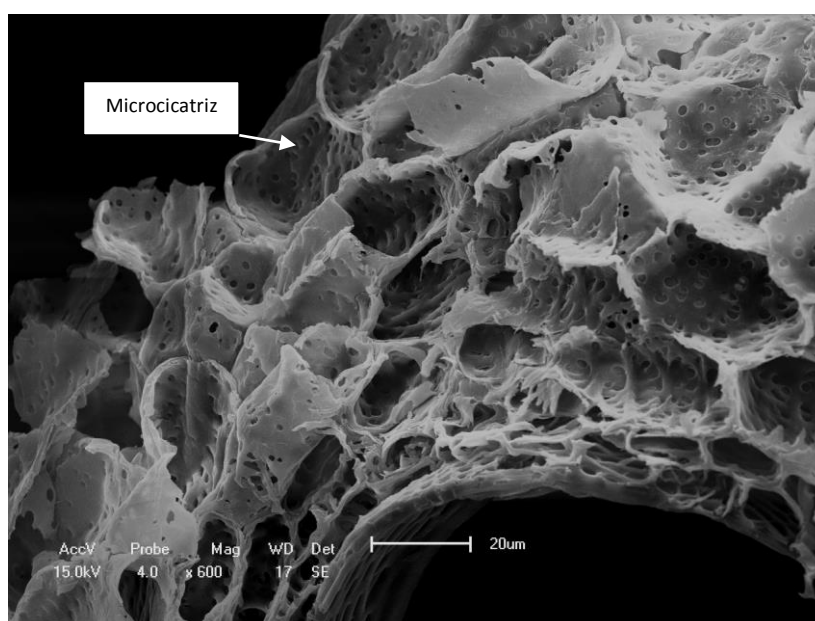


Figura 54 – Células de parênquimas da amostra após a 26ª extração para a remoção de amido no sistema semiaberto sob pressão

As fibras provenientes dos diferentes tratamentos foram comparadas a amostra *in natura* (Figura 55). Foi observado que as mesmas aparentam um desgaste (deformação/ruptura) após o tratamento, principalmente a proveniente da remoção do amido no sistema semiaberto sob pressão, fato esse ocorrido provavelmente pelo motivo já discutido no item 5.2.2.1.

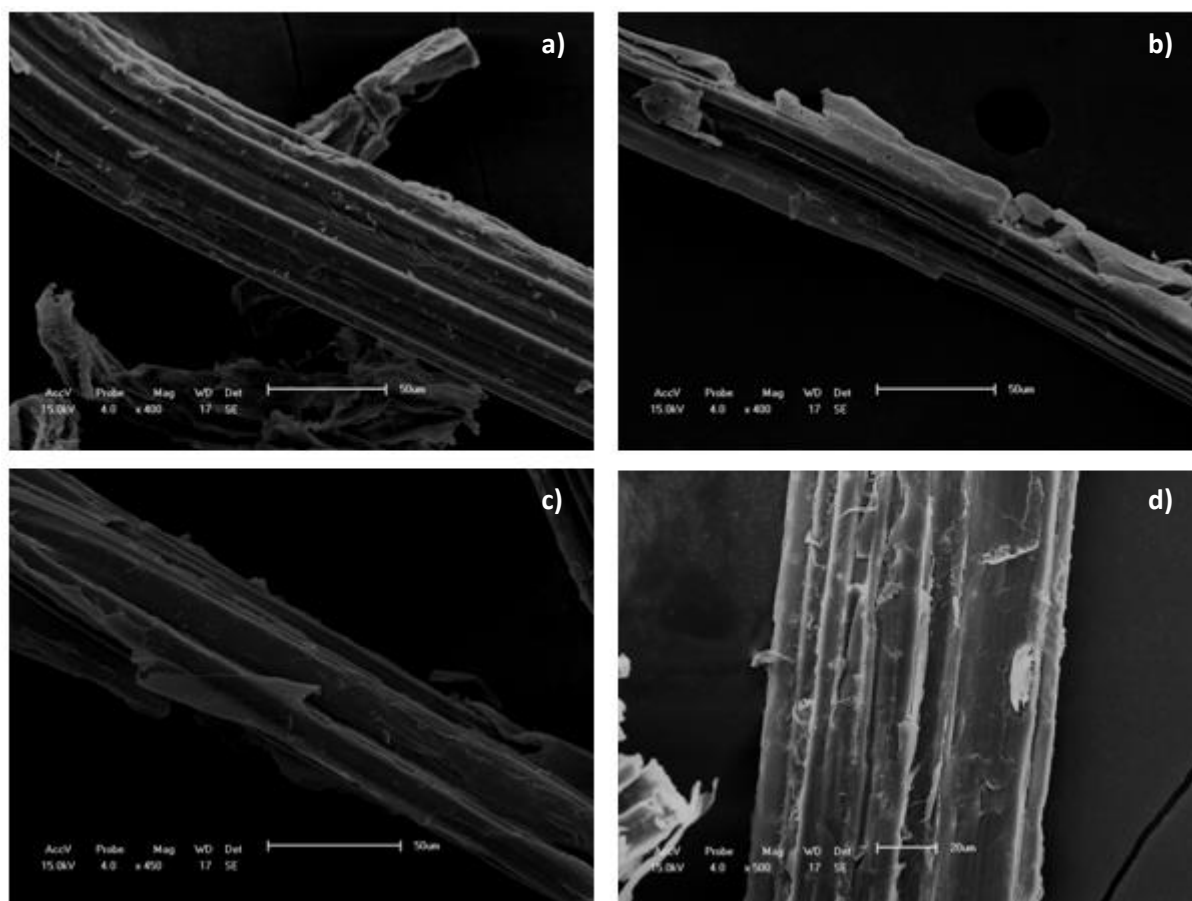


Figura 55 – Fibras de bambu proveniente de diferentes amostras: a) *in natura*; b) tratamento c/ 2% H₂SO₄; c) tratamento c/ 5% H₂SO₄ e d) Remoção do amido no sistema semiaberto sob pressão

A microscopia eletrônica de varredura confirma os resultados na remoção do amido através da sua remoção na biomassa, assim como, as modificações ocorridas na biomassa após os tratamentos.

5.2.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica apresentou se ocorreu alguma mudança no comportamento da biomassa vegetal através de sua perda de massa quando submetida a degradação térmica.

A primeira perda de massa, mostrado na Figura 56 e na Tabela 19 como 1º Evento, foi devido a evaporação de água contida nas amostras. Nenhuma das amostras foi analisada em base seca, apenas foram submetidas a uma redução do teor de umidade em estufa ($105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 6 horas). A amostra *in natura* para esta análise foi proveniente da armazenagem em caixa *box*, onde nesta, apenas houve uma redução da umidade em estufa ($60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 60 horas) como citado no item 4.1.

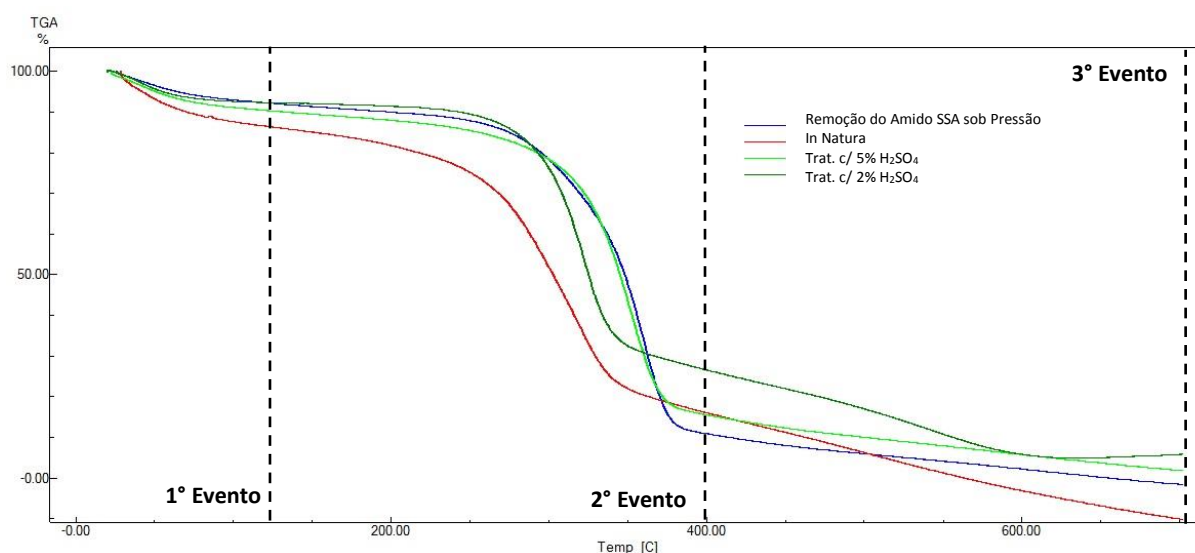


Figura 56 – Curva da TGA das amostras realizadas

Tabela 19 – Perda de massa em percentual na TGA

Amostra	1º Evento	2º Evento	3º Evento
In Natura	13,7 % (25-125°C)	65,9 % (125-360°C)	20,5 % (369-700°C)
Tratamento c/ Solução de H₂SO₄ 2% (v/v)	7,7 % (25-125°C)	62,6 % (125-370°C)	23,8 % (370-700°C)
Tratamento c/ Solução de H₂SO₄ 5% (v/v)	9,8 % (25-125°C)	73,8 % (125-390°C)	14,5 % (390-700°C)
Remoção do Amido no Sistema Semiaberto sob Pressão	7,8 % (25-125°C)	81,62 % (125-405°C)	12,1 % (405-700°C)

Mais de 50% da massa de todas as amostras foi perdida no intervalo de 125 a 405°C (2º Evento), resultados semelhantes aos de Guimarães Júnior (2013) para a mesma espécie de bambu submetida a diferentes tratamentos químicos. Essa perda é atribuída a compostos orgânicos não minerais como hemicelulose, lignina, celulose e outros.

Ainda no 2º evento foi observada uma diferença nas perdas de massa entre as amostras, segundo Guimarães Júnior (2013), essa pode ser atribuída aos tratamentos que as fibras sofreram pelas diferentes condições. Segundo o mesmo autor as amostras tratadas mostram maior estabilidade térmica em relação a *in natura* segundo a curva, visto que, retardaram o início da degradação principalmente a tratada com 5% de ácido e a que ocorreu a remoção do amido no sistema semiaberto sob pressão. Esse comportamento pode ser atribuído a maior remoção de materiais amorfo presente na biomassa nesses tratamentos.

Foi notado que, assim como nos tratamentos submetidos por Guimarães Júnior (2013), para a mesma espécie de bambu, as fibras se tornam termicamente mais estáveis, assim como, mais pura em relação a amostra *in natura*, tendo em vista que, as temperaturas de degradação das amostras foram retardadas de acordo com os tratamentos empregados.

5.3 SISTEMA DE RECUPERAÇÃO DE FURFURAL E 5-HMF

Foi constatada uma perda de água na hidrólise realizada no sistema semiaberto, o volume dessa perda no ponto ótimo foi de aproximadamente 400ml ao final do tempo decorrido e do acionamento do *flash*, algo esperado devido ao *design* do reator adotado. Através do sistema mostrado no item 4.4 foi recuperado na forma de condensado aproximadamente 75% desse volume. O condensado possuía aspecto hialino e com forte odor de furfural.

O sistema se mostra promissor para a recuperação dos condensados se observado os valores de remoção vistos na Tabela 17 e a recuperação obtida, desde que, posteriormente os condensados sejam direcionados a um sistema de concentração dos compostos com valores comerciais agregados.

5.4 FERMENTAÇÃO

Com a fermentação dos meios foi possível, além da obtenção de bioetanol, estudar o comportamento da operação e suas variáveis.

5.4.1 Preparação do Mosto de Bambu

No ajuste do pH para 5,0, foi formado um material insolúvel que escureceu o mosto de bambu (Figura 57), o mesmo foi removido por filtração simples (Figura 58) e não caracterizado.

Após autoclavação do mosto de bambu adicionado dos nutrientes, foi formado outro precipitado que não foi removido para o início da fermentação (Figura 59).

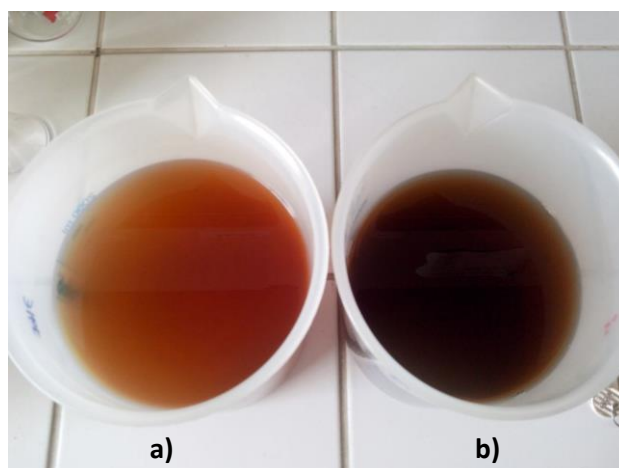


Figura 57 – Extrato proveniente da hidrólise ácida do bambu com a) pH menor que 1 e b) igual a 5



Figura 58 – Filtração do extrato hidrolisado de bambu com pH ajustado em 5



Figura 59 – Precipitado formado no mosto de bambu estéril

5.4.2 Processo Fermentativo

Foi iniciado o processo fermentativo do mosto de bambu e foi observado que a levedura inoculada, após decorrido alguns minutos, flotava no meio e quando agitado manualmente para melhor dispersão decantava no fundo do reator aglutinada ao precipitado citado no item 5.3.1 (Figura 50), pelas características e natureza do material possivelmente o precipitado era composto também por amido gelatinizado. Foi visto que, por conta desse fenômeno, não era possível coletar amostras representativas para a contagem de viabilidade celular na câmara Neubauer.

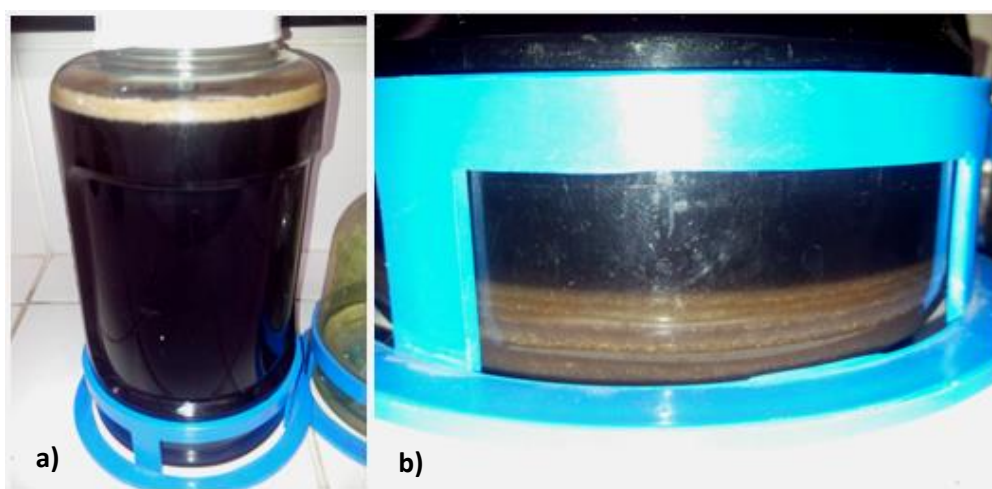


Figura 60 – Comportamento do inóculo de levedura no mosto de bambu:
a) flotando e b) decantada com o precipitado

Com a adição de agitação ao meio reacional foram resolvidos os problemas de flotação e precipitação do inóculo. Foi adicionada a agitação com barra magnética revestida de teflon e agitador magnético (Figura 61).

Para a contagem na câmara de Neubauer foi necessária uma diluição de 5 (cinco) vezes da amostra, devido ao comportamento da levedura em se aglutinarem em forma de cachos dificultando a contagem (Figura 62).



Figura 61 – Sistema de fermentação com agitação magnética

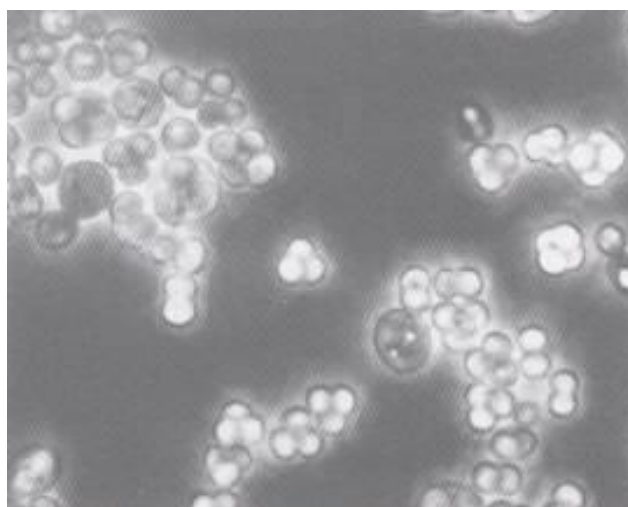


Figura 62 – Arranjo em cacho da *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte: http://lucio15.altervista.org/vino/nuova_pagina_1.htm

5.4.3 Parâmetros Cinéticos

Transcorrido as 72h após o início da fermentação adotando o regime de coleta mostrado no Quadro 4, assim como, contabilizando as células de leveduras (viáveis e inviáveis) e mensurando os teores de açúcares redutores totais e bioetanol com suas respectivas metodologias, foi possível, através dos cálculos cinéticos adotados, comparar o mosto de bambu com o mosto padrão de glicose. Resultados mostrados na Tabela 20.

Tabela 20 – Resultados cinéticos da fermentação

	Mosto Padrão	Mosto Bambu
Substrato Inicial¹ (g/l)	15,80	15,60
Substrato Final² (g/l)	0,78	3,02
Etanol Produzido (g/l)	8,05	4,14
Biomassa Celular Inicial (g/l)	3,99	2,08
Biomassa Celular Final (g/l)	11,61	9,31
Rendimento³ (%)	50,96	26,54
μ máx (g/g.h)	0,168	0,228
K_s (g/l)	0,084	0,114
g (h)	4,127	3,041
Y_{X/S} (g/g)	0,509	0,575
Y_{P/S} (g/g)	0,528	0,329
α^4 (médio)	1,923	0,684
β^4 (médio)	0	0

(1) Analisado no Tempo 0 (zero); (2) Analisado após 72h; (3) Rendimento teórico é de 51,1%

(4) Coeficientes da equação de Luedeking e Piret

Apesar da quantidade de inóculo inicial serem iguais para ambos os mostos (3g/l), de mesmo fabricante e lote, a coleta realizada no tempo zero apresentou biomassa celular inicial (g/l) diferentes entre si, possivelmente, mesmo com a agitação submetida aos meios reacionais algumas células continuaram sendo, de alguma forma, decantadas no mosto do bambu para o fundo do reator pelo

precipitado mostrado no item 5.4.2 tornando-se mais difícil a sua coleta pelo amostrador ou até, pode ter ocorrido a morte de algumas células, devido a pressão osmótica e a toxicidade mais elevadas proveniente da degradação pelo ácido de outros materiais presentes na biomassa em relação ao mosto padrão.

Através dos resultados expostos na Tabela 20 foi observado que o rendimento na produção de bioetanol do mosto de bambu foi menor em relação ao padrão em 47,90% para a, provavelmente devido a alguns açúcares contido no mosto de bambu não serem utilizados como fonte de carbono pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pois, parte deles foram possivelmente proveniente da hemicelulose, que é por sua vez, rica em xilose e arabinose, ambos açúcares redutores não fermentescíveis pela levedura utilizada.

Segundo Alper e Stephannopoulos (2009) *apud* Barcelos (2012) a *S. cerevisiae* durante sua evolução não foi exposta a diferentes açúcares, à componentes aromáticos e as e às condições adversas (alta pressão osmótica, subprodutos inibidores, entre outros) tipicamente presentes em meios resultantes da hidrólise de substratos lignocelulósicos. Salienta-se que o mosto pode conter, além de furfural e 5-HMF, outros compostos inibitórios de fermentação como ácido acético e ácido fórmico, este último, proveniente da hidrólise ácida a quente do furfural.

A constante de Saturação (K_s) do mosto padrão foi numericamente menor que a do mosto de bambu que, segundo Borzani *et al.* (2001), quanto menor for o valor dessa constante mais amplo será o patamar da curva e que se encontrará mais próximo de $\mu_{m\acute{a}x}$, isso demonstra, segundo Silva Filho (2015), a maior afinidade da levedura entre o substrato glicose do mosto padrão em relação aos açúcares do mosto de bambu, resultado plausível, visto que, o mosto padrão é composto apenas por uma única fonte de carbono utilizado pelo microrganismo.

O tempo de geração (g) do mosto padrão foi mais elevado devido primeiramente a velocidade de crescimento específica máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) do mosto de bambu ser levemente superior, como também, a concentração de células na fase de crescimento do mosto padrão ser 17,58% superior a do mosto de bambu. Contudo, o tempo de geração de ambos meios foi relativamente alto para a cinética estudada, fato que pode ser vinculado, entre outras variáveis, ao lote da levedura utilizada.

A conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) dos experimentos foi praticamente igual, entretanto, a conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) foi maior no mosto padrão em relação ao mosto de bambu, visto que, o mosto padrão não possui em

sua composição limitantes expressivos. Esse resultado é diretamente proporcional ao rendimento da fermentação e a variação entre os valores pode ser atribuída aos mesmos motivos do rendimento.

Nas Figuras 63 e 64 foi confirmado o consumo do substrato glicose no mosto padrão ser de mais fácil absorção para a levedura, pois, com praticamente 12 horas após o início da fermentação o microrganismo já havia consumido praticamente todo o substrato. O aumento da sua massa após praticamente todo o consumo do substrato pode está associada a outras fontes de nutrientes que a levedura usou para sua manutenção como o extrato de levedura e ureia. Foi notado também que, às 6 horas iniciais da fermentação o consumo do substrato para ambos meios foram muito semelhantes, provavelmente devido ao consumo dos açúcares mais simples como glicose e outros contidos no mosto do bambu.

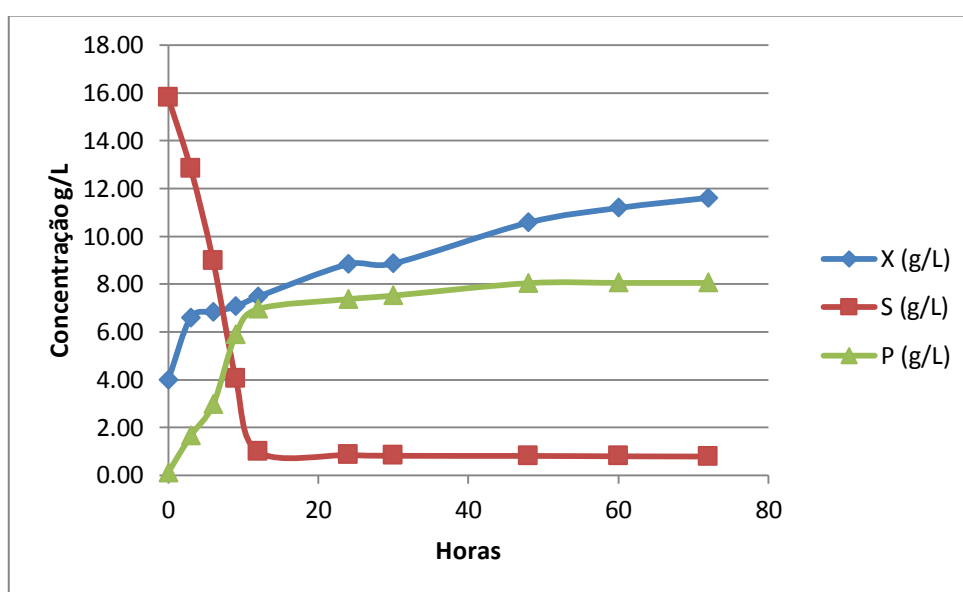


Figura 63 – Perfil cinético do mosto padrão onde: X e a concentração da biomassa celular, S o substrato e P o produto.

Também na Figura 64 foi observado que a biomassa celular produzida, como já citada, foi menor no mosto de bambu, provavelmente devido a presença de açúcares não assimiláveis pela levedura. Foi notado que nas primeiras 6 horas, a *S. cerevisiae* consumiu provavelmente todos os açúcares mais simples disponíveis e que ao longo da fermentação teve mais dificuldades no consumo dos outros açúcares que por sua vez deveriam ser mais complexos como di- ou trissacarídeos.

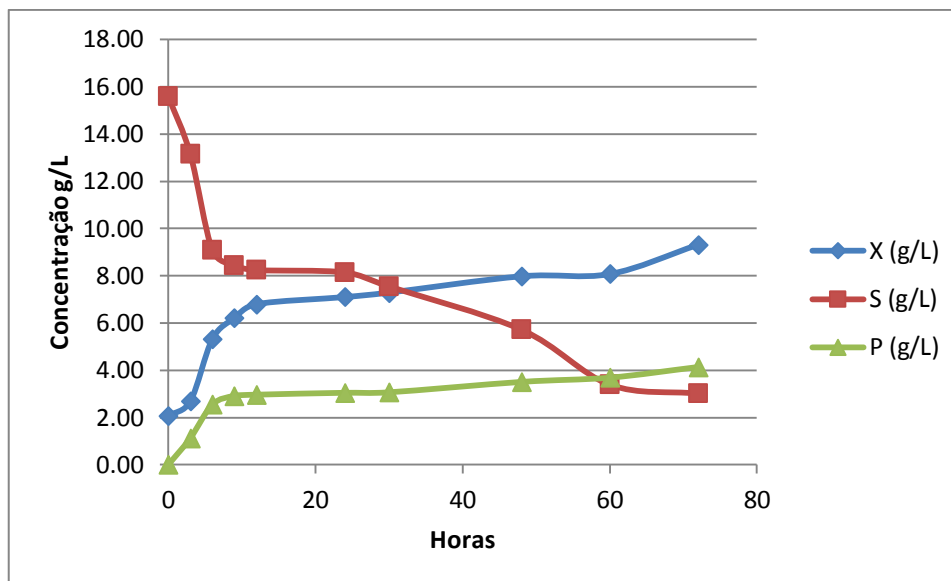


Figura 64 – Perfil cinético do mosto de bambu onde: X e a concentração da biomassa celular, S o substrato e P o produto

O gráfico da Figura 64 ainda mostra que após 60h de fermentação houve um leve crescimento celular e na produção de etanol, assim como, um consumo de substrato, isso pode ter ocorrido por causa de uma possível readaptação da levedura para as fontes de carbono disponíveis no meio.

A produção de bioetanol mediante consumo de subtrato do mosto de bambu foi distinto, pois, enquanto a levedura no mosto padrão produziu 5,88g/L de etanol consumindo aproximadamente 12 g/L do substrato, o mosto de bambu produziu 3,69g/L de bioetanol para o mesmo consumo de açúcares.

Foi avaliado os coeficientes da Equação 6.6 descrita por Luedeking e Piret (1959) junto ao gráfico mostrado na Figura 65. O modelo descrito e calculado (ver Tabela 20) mostrou-se válido para α diferente de zero e β igual a zero, pois, graficamente também se observou que o produto formado é associado ao crescimento característico diante o tipo de substrato, a levedura escolhida e o produto obtido.

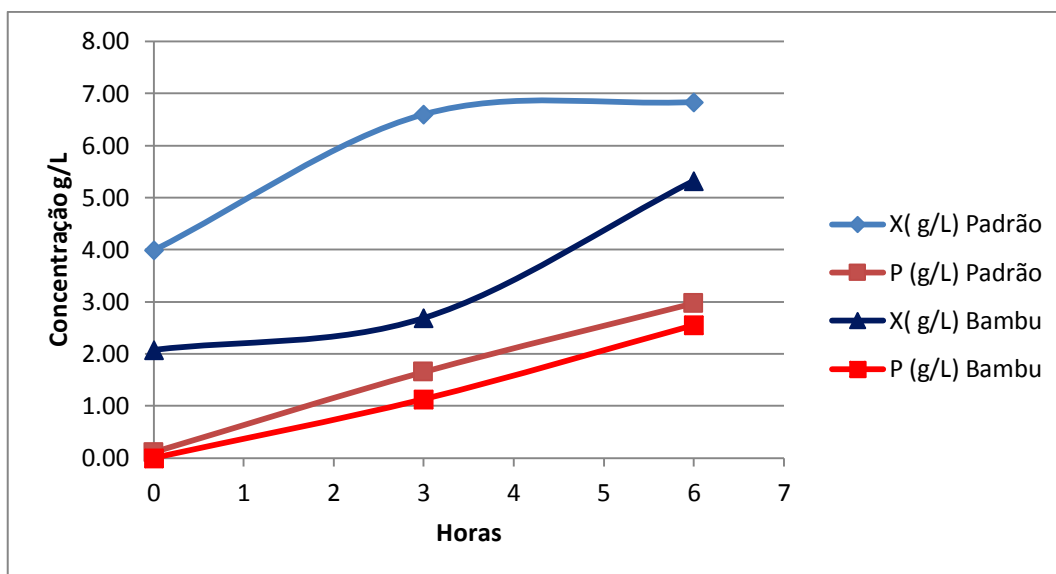


Figura 65 – Perfil de formação de produto em relação ao aumento da biomassa celular

5.5 BALANÇO MATERIAL FINAL

Com os resultados obtidos nesta pesquisa e com as considerações descrita no Quadro 6, foi montado um fluxograma do balanço material final no conceito de biorrefinaria na produção de etanol proveniente do bambu.

Quadro 6 – Considerações para o balanço de material final

Parâmetro	Valor adotado	Referência
Densidade do Etanol	789Kg/m ³	-
Rendimento da Fermentação do Mosto de Bambu	26,5%	Tabela 20
Teor de Umidade do Bambu	20%	SANTI (2015)
Produção de Celulose de Bambu no Brasil	150.000 t/ano	SANTI (2015)
Rendimento de Celulose proveniente do Bambu	50%	PIOTTO (2003)
Colheita de Bambu no Brasil para Celulose	300.000 t/ano (estimado)	SANTI (2015) e PIOTTO (2003)
Produção de Etanol por tonelada de Cana-de-Açúcar	85 litros	OGATA (2013)
Produção de Etanol safra 2014/2015	28,65 bilhões de litros	CONAB (2015)

Foi constatado que o volume de etanol por tonelada do bambu é superior em 16,6% em relação cana-de-açúcar (Figura 66), se destaca dois pontos importantes:

o primeiro é que o bambu é perene, isto é, não há época de crescimento específico e a mesma planta aceita vários cortes não necessitando de replantio como citado anteriormente; o segundo ponto é que, o rendimento em etanol da fermentação do mosto de bambu foi praticamente a metade do rendimento obtido quando o mosto é proveniente da cana-de-açúcar. Na Figura 66, foi observado também que o volume obtido de álcool proveniente do bambu aumentaria a produção anual brasileira em 0,14%, um valor relativamente baixo, porém se fermentado com outros tipos de microrganismos poderia se obter outros produtos de valor comercial como o ácido glucônico.

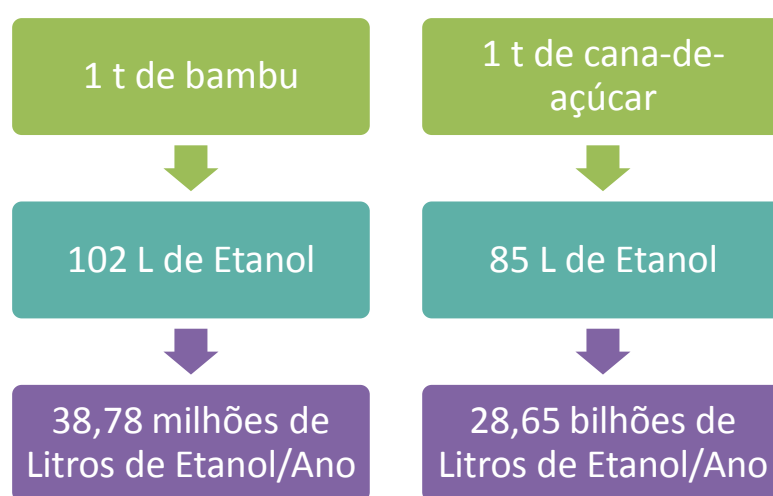


Figura 66 – Comparação entre o etanol proveniente do bambu e cana-de-açúcar

Os resultados descritos por Azzini *et al.*(1987a) de 127,7 a 147,9 litros de etanol/t de bambu foram acima dos obtidos neste estudo. Porém os mesmos não fermentaram os açúcares obtidos em seus experimentos de hidrólise apenas estimaram o rendimento em etanol diante os valores de açúcares obtidos em seus estudos na hidrólise da biomassa do bambu.

6 CONCLUSÕES

Com bases nos experimentos realizados concluiu-se que:

- a) Os colmos de bambu utilizados neste trabalho, por serem relativamente novos em comparação ao diâmetro máximo do colmo maduro alcançado pela espécie, continham teor máximo de amido de 11,37%, esse teor tende a aumentar com colmos mais velhos;
- b) A remoção do amido do bambu apenas com água a 100°C e 120°C sob pressão de 1kgf/cm² obteve baixos rendimentos além do desgaste demasiado demonstrado nas fibras no sistema de contínuas extrações, porém, serve como teste qualitativo de amido no colmo, assim como, uma explanação das características da biomassa vegetal avaliada;
- c) O melhor rendimento na produção de açúcares redutores totais nas condições das hidrólises avaliadas foi de 15,40±0,65g/L com 2% v/v de H₂SO₄, como agente hidrolisante, tempo de 50 minutos e com o bambu na forma de cavacos passando por desfibramento de 90 segundos;
- d) O processo de hidrólise ácida adotado não hidrolisa a celulose, porém, hidrolisa tanto o amido quanto a hemicelulose contida na biomassa vegetal e, como resultado do tratamento, obteve-se outros açúcares redutores proveniente da hemicelulose não metabolizados pela levedura *S. cerevisiae*;
- e) O furfural e 5-hidroximetilfurfural formados na hidrólise podem ser recuperados em 36,00% e 46,59% respectivamente através do sistema de *flash* com condensação desenvolvido para a pesquisa;
- f) É possível obter bioetanol do amido contido no bambu submetendo a biomassa vegetal à hidrólise ácida em condições relativamente brandas: temperatura de 121°C, pressão de 1kgf/cm² e solução de 2% v/v de H₂SO₄, restando-se assim a celulose com 27,03% menos resíduos para possível prosseguimento na fabricação de papel e celulose;
- g) A levedura *S. cerevisiae* sozinha não consegue converter todos os açúcares obtidos da hidrólise em etanol, devido ao fato da mesma não apresentar sistema enzimático capaz de realizar o metabolismo;

- h) O volume de etanol obtido por tonelada de bambu através dos métodos aplicados e das referências utilizadas é superior em 16,66% ao obtido por tonelada de cana-de-açúcar;
- i) Perante a produção brasileira de celulose proveniente do bambu o volume obtido de bioetanol, se a biorrefinaria fora adotada, acrescentaria pouco a produção anual desse combustível, entretanto, otimizaria o processo na fabricação de celulose eliminando interferentes e subprodutos prejudiciais ao meio ambiente, como também, geraria outros produtos nobres na mesma planta fabril.

Embora o processo desenvolvido no experimento demonstre potencial para o conceito de biorrefinaria para a produção conjunta de celulose e etanol utilizando-se o bambu, muito ainda pode ser investigado e explorado para o aprimoramento desse conceito. Então, se elenca abaixo sugestões de trabalhos futuros.

- a) Explorar outras condições na hidrólise como: maior pressão e outras concentrações do(s) ácido(s) envolvido(s), como também, utilização de enzimas em um pré ou pós-tratamento da biomassa para maior rendimento em açúcares redutores ou arraste de vapor na biomassa;
- b) Investigar mais profundamente os compostos formados na hidrólise, visto que, o rendimento menor em etanol pode estar vinculado não apenas aos açúcares não fermentescíveis pela levedura utilizada (xilose e arabinose), como a outros interferentes que podem ter sido formados na hidrólise, inibindo uma elevação do rendimento da fermentação;
- c) Avaliar se o escurecimento da biomassa vegetal após a hidrólise ácida tem algum impacto como menor resistência das fibras celulósicas ou consumo adicional de reagentes no branqueamento do papel produzidos com a celulose posterior pré-tratamento;
- d) Caracterizar o precipitado formado no mosto de bambu no aumento do pH para 5 como preparação para fermentação;
- e) Investigar a fermentação com outras culturas além da *S. cerevisiae* a levedura *Pichia stipitis* que metaboliza xilose e outros açúcares e se mostra promissora para hidrolisado lignocelulósicos, assim como, *Scheffersomyces stipitis*, *P. tannophilus* e *Candida shehatae*.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; MCGUIRE, T.; LEE, R. S.; BECVAR E. Considerations for the design of organic mulch permeable reactive barriers. **Remediation Journal**, v. 18, n. 1, p. 59-72, 2007.
- ALMEIDA, R. R.; LACERBAD, L. L.; MURAKAMIB, F. S.; BANNACHD, G; DEMIATEA, I.M.; SOCCOLC, C. R.; FILHO, M. A. S. C.; SCHNITZLERA, E.; Thermal analysis as a screening technique for the characterization of babassu flour and its solid fractions after acid and enzymatic hydrolysis. **Thermochimica Acta**, v.519, n.1-2, p.50-54. 2011.
- ALPER, H.; STEPAHNOPOULOS, G. Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential? **Nature Reviews**, v.7, p.715-723, 2009.
- ALVES, S. T.; PACHECO, T. F.; MACHADO, C. M. M.; NETO, B. A. D.; GONÇALVES, S. B. Estudo da inibição de HMF e furfural na fermentação do hidrolisado de madeira de *Eucalyptus urophylla*. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA**, 20º, 2014, Florianópolis. Brasília, 2014.
- ARAUJO, E. C. G.; SILVA, T. C.; FRANÇA, P. H. T.; LIMA, A. O.; OLIVEIRA, W. J.; BARRETO, L. P. Determinação dos Componentes Estruturais da Madeira do Angico Vermelho. In: **JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**, 13ª, 2013, UFRPE Recife. Recife, 2013.
- AZZINI, A. Amido a partir de Bambu. **Bragantia**, Campinas, v. 43, n. 1, p.45-50, 1984.
- AZZINI, A. Desfibramento do bambu visando a produção conjunta de celulose e amido: I Extração de amido. **Congresso Anual da ABCP**, São Paulo, v. 1, n. 16, p.229-240, nov. 1983.
- AZZINI, A; ARRUDA, M. C. Q. Sacarificação da Serragem de Bambu Visando ao Estabelecimento de um Método de Determinação de Amido. **Bragantia**, Campinas, v. 45, n. 1, p.15-22, 1986.
- AZZINI, A.; ARRUDA, M. C. Q.; CIARAMELLO, D.; SALGADO, A. L. B.; FILHO, M. T. Produção Conjunta de Fibras Celulósicas e Etanol a partir do Bambu. **Bragantia**, Campinas, v. 46, n. 1, p.17-25, 1987a
- AZZINI, A.; ARRUDA, M. C. Q.; FILHO, M. T.; SALGADO, A. L. B.; CIARAMELLO, D. Variações dos Teores de Fibras Celulósicas e Amido no Colmo de Bambu. **Bragantia**, Campinas, v. 46, n. 1, p.141-145, 1987b.
- AZZINI, A.; CIARAMELLO, D.; SALGADO, A. L. B.; Velocidade de crescimento dos colmos de algumas espécies de bambu. **Instituto Agrônomo de Campinas**, Campinas, S.P. 1981.

AZZINI, A.; GONDIM-TOMAZ, R. M. A. Extração de Amido em Cavacos de Bambu Tratados com Solução Diluída de Hidróxido de Sódio. **Bragantia**, Campinas, v. 55, n. 1, p.215-219, 1996.

AZZINI, A.; SALGADO A. L. B.; TEIXEIRA, J. P. F.; MORAES, R. M. Obtenção de Amido a partir do Colmo de Bambu. **Bragantia**, Campinas, v. 40, n. 7, p.211-216, 1981.

AZZINI, A.; SILVA, M. T. R.; SILVA J. P. R. Teor de carboidrato em colmos de Bambusa vulgaris Schrad. **Bragantia**, Campinas 38:15-17, 1979.

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

BARCELOS, C. A. **Aproveitamento das Frações Sacarínea, Amilácea e Lignocelulósica do Sorgo Sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] para a Produção de Bioetanol**. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BARRE, P.; DEQUIN S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES J. M.; BLONDIN B.; SALOMON, J. M. La levadura de fermentación alcohólica. In: FLANZY, C. **Enología: fundamentos científicos e tecnológicos**. Madrid: Mundi-Prensa e AMV, p. 274-315, 2000.

BARROS, R. B. Obtenção de amido e seus derivados. **Refinações de Milho Brasil Ltda**. 35p, 1984.

BASTOS, V. D. Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. **Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, mar. 2007.

BENINCA, C. **Emprego de técnicas termoanalíticas na análise de amidos nativos e quimicamente modificados de diferentes fontes botânicas**. (Mestrado). Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

BERALDO, A.L., AZZINI, A. Bambu: características e aplicações. **Guaíba: Agropecuária**. 2004.

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

BOMTEMPO, J. V. O futuro dos biocombustíveis II: Por que a indústria de biocombustíveis do futuro será diferente da que conhecemos hoje? **Blog Infopetro**, 2011.

BONORA, F. S.; ALMEIDA, R.S.R.; BRITO, J.O. **Teor de extrativos solúveis em água quente da espécie *Tecoma stans***. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial, Volume 2, Engenharia Bioquímica**, 1a ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Cioresource Technology**, Califórnia, p. 4862-4874, nov. 2009.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C., Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca. **Revista Energia na Agricultura**, UNESP, Botucatu-SP, vol 20, n.4, pg 36-52, 2005.

CASTRO, A. M.; ANDRÉA, T. V.; CARVALHO, D. F.; TEIXEIRA, M. M. P.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Valorization of Residual Agroindustrial Cakes by Fungal Production of Multienzyme Complexes and Their Use in Cold Hydrolysis of Raw Starch. **Waste and Biomass Valorization**, p.291-302. 2011

CASTRO, H. F. **Papel e Celulose: Processos Químicos Industriais II** Apostila 4. 2009. Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena. Disponível em: <sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/5840556/434/apostila4papelecelulose.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2016.

CEREDA, M. P. Série: **Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. Fundação Cargill, 2001, São Paulo. 1773p.

CHRISTIANSON-HEISKA, I. L.; HAAVISTO T.; PARANKO J.; BERGELIN E.; ISOMAA B. Effects of the wood extractives dehydroabietic acid and betulinol on reproductive physiology of zebrafish (*Danio rerio*) - A two-generation study. **Aquatic Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 388-396, 2008.

CINELLI, B. A. **Produção de Etanol a Partir da Fermentação Simultânea à Hidrólise do Amido Granular de Resíduo Agroindustrial**. Dissertação (Mestrado) - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

CONAB - **COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO**. Acompanhamento da Safra Brasileira. Cana-de-açúcar. Brasília, 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_13_08_45_51_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_14-15.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2016.

COPELAND, L.; BLAZEK, J.; SALMAN, H.; TANG, M. C. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v.23, n.6, p.1527-1534. 2009.

CURRELI, N.; AGELLI, M.; PISU, B.; RESCIGNO, A.; SANJUST, E.; RINALDI, A. et al. Complete and efficient enzymic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Process Biochemistry**, Oxford, v.37, p. 937-941, 2002.

DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.63, p.258–266, 2003.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation Products on ethanol fermentations of Glucose and Xylose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.19, p.220-225, 1996.

FANI, M. (São Paulo) (Ed.). AMIDOS: Fontes, Estruturas e Propriedades Funcionais. **Aditivos e Ingredientes**, São Paulo, v. 124, n. 1, p.26-37, maio 2013. Disponível em: <www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/124.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2016.

FARRELL, A. E.; PLEVIN, R. J.; TURNER, B. T.; JONES, A. D.; O'HARE, M.; KAMMEN, D. M. Ethanol Can Contribute to Energy and Environmental Goals. **Science**, v.311, n.5760, January 27, 2006, p.506-508. 2006.

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

FIGUEIRA, E. L. Z. e HIROOKA, E. Y. Culture medium for amylase production by toxigenic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, p.461-467. 2000.

FOELKEL, C.; KLEINE, H. J. **Revista On-line PinusLetter**: Edição N° 37. 2012. Disponível em: <http://www.celso-foelkel.com.br/pinus_37.html>. Acesso em: 02 maio 2016.

FRANCISCO, R. P.; CURVELO, A. A. S. Caracterização Química de Polpa Quimiotermomecânica de *Eucalyptus grandis*, 2009.

GOLDEMBERG, J., NIGRO, F. E. B. e COELHO, S. T. Bioenergia no estado de São Paulo: Situação atual, perspectivas, barreiras e propostas. : São Paulo: **Imprensa Oficial do Estado de São Paulo**. 2008. 152p.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de Metodologia para a Caracterização Química de Bagaço de Cana-de-Açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p.1500-1503, 2009.

GUIMARÃES JUNIOR, M. Estudo da Modificação Química de Polpa Kraft de Bambu com Dianidrido 3,3',4,4' Benzofenona Tetracarboxílico. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, Espanha, v. 14, n. 1, p.196-205, 2013.

GUIMARÃES JUNIOR, M; NOVACK, K. M.; BOTARO, V. R. Caracterização Físico-Química de Fibra e Polpas de *Bambusa vulgaris* Schrad para Utilização em Compósitos Poliméricos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, Espanha, v. 11, n. 7, p.442-456, 2010.

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

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LINDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v.24, 2006

HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and longterm. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 384-410, 2005.

HATFIELD, R. D.; JUNG, HJ. G.; BRODERICK, G.; JENKINS, T. C. Nutritional chemistry of forages. In: BARNES, R. F.; NELSON, C. J.; MOORE, K. J.; COLLINS, M. (Ed.). **The Science of Grassland Agriculture**. 6. ed. Ames: Blackwell, 2007. v. 2. cap. 31, p. 467-485.

HINO, I. Icones fungorum *bambusicolorum japonicorum*. **Yamagutiensi**. Facultate Agriculturae in Universitate., 1961. 336p. il.

HOFRICHTER, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.45, n.3, p.253-267. 2001.

INGLEDEW, W. M. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer. In: (Ed.). **The alcohol textbook**. 3rd. ed: UK: Nottingham University Press. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer, 1999.

IPCC. **Climate change 2007: the physical science basis**. Cambridge University Press. Cambridge. 2007.

JANK, M. S. A competitividade do etanol brasileiro. **UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar**. 31 ago. 2009. Disponível em: <[http://www.senado.gov.br/sf/comissoes/ci/ap/AP20090831_Comissao_Infraestrutura_Marcos%20_Jank_\(res\).pdf](http://www.senado.gov.br/sf/comissoes/ci/ap/AP20090831_Comissao_Infraestrutura_Marcos%20_Jank_(res).pdf)>. Acesso em: 07 fev. 2012.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, p.1–7, 2006.

JEFFRIES, T. W.; JIM, Y. S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.3, n.5, p.495-509, 2000.

JONES, R. P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P. F. Alcohol fermentation by yeasts: the effect of environmental and other variables. **Process in Biochemistry**, v.15, n.4, p.42-49, 1981.

KAMAYA, Y.; TOKITA, N.; SUZUKI, K. Effects of dehydroabietic acid and abietic acid on survival, reproduction, and growth of the crustacean *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, n. 1, p. 83-88, 2005.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 64, n. 2, p.137-145, 2004.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie-International Edition**, v.44, n.22, p.3358-3393, 2005.

KRISHNA, S. H.; REDDY, T. J.; CHOWDARY, G. V. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. **BioresourceTechnology**, Amsterdam, v. 77, p. 193-196, 2001

LEIVISKÄ, T.; RÄMÖ, J. Coagulation of wood extractives in chemical pulp bleaching filtrate by cationic polyelectrolytes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, n. 1-2, p. 525-531, 2008.

LI, J.; YUAN, H.; YANG, J. Bacteria and lignin degradation. **Frontiers of Biology in China**, v. 4, n. 1, p. 29-38, 2009.

LIESE, W.; The anatomy of bamboo culms. **International Network for Bamboo and Rattan**, China, 1998, 208 p.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In:- **Biotecnologia**. São Paulo: E. Blucher, 2001, v. 3, p. 1-43.

LOHMEIER-VOGEL, E. M.; SOPHER, C. R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 75-81, 1998.

LOPEZ, L. F. e CORREAL, J. F. "Exploratory study on the glued laminated bamboo *Guadua angustifolia* kunt as a structural material". **Maderas: Ciencia y Tecnologia**, 2009; 11 (3): p.171-182.

LUEDEKING, R., PIRET, E.L. Kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. **Journal of Biochemical, Microbiology and Technology**, Eng. 1, 393, 1959

LUNDUBWONG, N.; SEIB, P. A. Rice starch isolation by alkaline protease digestive of wet-milled rice flour. **Journal of Cereal Science**, New York, v. 31, n. 1, p. 63-74, 2000

LYBEER, B. **Age-related anatomical aspects of some temperate and tropical bamboo culms (Poaceae: Bambusoideae)** (Vol. Tese de para obtenção do título de Doutor). Gent: Universiteit Gent – Faculteit Wetenschappen, 2006.

MENEZES, T. J. B. e AZZINI, A. O bambu, uma nova matéria-prima para a produção de etanol. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 18:145-154, 1981.

MI, Y.; CHEN, X.; GUO, Q. "Bamboo Fiber reinforced Polypropylene Composites: Crystallization and Interfacial Morphology." **Journal Applied Polymer Science**, 1997; 64: p.1267–1273.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, 2012/01/16, p.426-428. 1959.

MIYAUCHI, T.; MORI, M.; ITO, K. Quantitative determination of benzalkonium chloride in treated wood by solid-phase extraction followed by liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1095, n. 1-2, p. 74-80, 2005.

MOCHIDZUKI, K.; SAKODA, A; SUZUKI, M. Liquid-phase thermogravimetric measurement of reaction kinetics of the conversion of biomass wastes in pressurized hot water: a kinetic study. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 421-428, 2003.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. **Energy and Fuels**, v.20, p.848-889, 2006.

MONOD, J.. The Growth of Bacterial Cultures. **Annual Review of Microbiology**, v. 3, p. 371. 1949

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

MOREIRA, A. C. O. **Caracterização de *Bambusa vulgaris* Schard. ex J.C. Wendl. var. *vulgaris*, e dos Resíduos de Caldeira no Processo de Conversão Térmica de Energia**. 2012. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Florestais, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília - Faculdade de Tecnologia, Brasília, 2012.

MURPHY, P. Starch. In: G. O. Phillips e P. A. Williams (Ed.). **Handbook of hydrocolloids**. New York: CRC Press LLC Corporate Blvd, 2000. Starch.

MUSSATO, I. S.; ROBERTO, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 28, p. 24-39, 2004.

NMBA-National Mission on Bamboo Applications. **Bamboo flooring - market assessment**. MA 01. Nova Delhi, 2004. Disponível em: <http://www.bambootech.org/index.asp>. Acesso em: 15 Mar. 2010.

NREL. Glossary of Biomass Terms. The National Renewable Energy Laboratory. U.S. Department of Energy: Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/glossary.html>. Acesso em Dez. 2011.

NUNES, R. de M.; ARAÚJO, R. F. de; GUARDA, E. A. Avaliação do Potencial de Produção de Etanol por Hidrólise Enzimática do Licor Negro Gerado na Produção de Papel a partir de Farelo de Arroz. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 16, n. 4, p.433-437, 2014.

OCTAVE, S.; THOMAS, C. Biorefinery: toward and industrial metabolism. **Biochimie**, v.91, p.659-664, 2009.

OGATA, B. H. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias**. 2013. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Área de Ciências e Tecnologia dos Alimentos, Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2013.

OLIVEIRA, D. A. *et al.* Alocação de biomassa em plantas de bambu em resposta a adubação mineral (nº 2 ed., Vol. 9). **Curitiba: Scientia Agraria**, 2008.

OLIVEIRA J. G. **Perspectivas para a cogeração com bagaço de cana-de-açúcar: potencial do mercado de carbono para o setor sucroalcooleiro paulista**. 2007. 160 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de produção) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

OLIVEIRA, L. C. **Indústria de etanol no Brasil: uma estrutura de mercado em mudança**. 2009. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Econômico) - Setor de Ciências Sociais Aplicadas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

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

PANDEY, A. *et al.* Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresouce Technology**, Amsterdam, v. 74, p. 81-87, 2000.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v.66, p.25-40, 1998.

PEARL, R. The growth of populations. **The Quarterly Review of Biology**. , v.2, p.532-548. 1927.

PEDRENHO, A. R.; SILVA, S. A.; CHAGAS, G. M.; MACHARETTI, H. Química Fisiológica - IB 309: Curso Prático. 2008. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Instituto de Biologia Departamento de Ciências Fisiológicas. Disponível em: <www.ufrj.br/institutos/ib/dcf/qfis/apostilaP.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2016.

PEREIRA, F. M. **Modelagem e Simulação de Processos Fermentativos**. Escola de Engenharia de Lorena Universidade de São Paulo. Disponível em: <<http://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/5817066/94/MSPF.pdf>>. Acesso em: 03 mar. 2016.

PEREIRA JR, N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic compostion for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**. Biblioteca Nacional: Rio de Janeiro, v. 2, 2008.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 53-63, 2002.

PIOTTO, Z.C. **Eco eficiência na indústria de Celulose e Papel: estudo de caso**. 2003. Tese (Doutorado). Escola politécnica de São Paulo, 2003.

PLÁ, J. A. **Histórico do biodiesel e suas perspectivas**, 2003. Disponível em <www.ufrgs.br/decon/publionline/textosprofessores/pla/hist_rico.doc>, acesso em 27 de novembro de 2011

PORTO, L. M. **Modelagem de processo industrial de fermentação alcoólica contínua com reatores de mistura ligados em série**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas-Unicamp, Campinas, 2005.

PRIMO-YÚFERA, E.; GIL-TORTOSA, C. I.; GARCÍA-BREIJO, F. J. Hydrolysis of corncob lignocellulosic residue from pentose preparation. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 52, p. 1-4, 1995.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v.26, p.863-871, 2003.

RAGASKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVISON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKET C. A.; FREDERICK W. J Jr.; HALLET J. P.; LEAK D. J.; LIOTTA C. L.; MIELENZ J. R.; MURPHY R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. The path forward for biofuels and biomaterials. **Science**, v.311, n.5760, p.484-489. 2006.

READING, N. S.; WELCH, K. D.; AUST, S. D. Free radical reactions of wood-degrading fungi. In: Wood Deterioration and Preservation: Advances in Our Changing World, **Washington: ACS Symposium Series**, v. 845, p.16-31, 2003.

REE, R. V.; ANNEVELINK, B. Status Report Biorefinery. Agrotechnology and Food **Sciences Group**. Wageningen: November 2007.

RIBEIRO, F. J.; LOPES, J. J. C.; FERRARI, S. E. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica. **Brasil Açucareiro**, v. 105, n. 1, p. 26-30, 1987.

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

RUSSELL, I. Understanding yeast fundamentals. In: (Ed.). **The Alcohol Textbook**. A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries: UK: Nottingham University Press, 2003. Understanding yeast fundamentals.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.279–291, 2003.

SAITO, I. M. **Produção de Hidrolisados e Fibras a Partir de Resíduo da Industrialização da Mandioca Submetido a Pré-Tratamento Hidrotérmico**. 2005. 109 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2005.

SAITO, I.M.; CABELLO, C.. Produção de etanol a partir de hidrolisado obtido por tratamento hidrotérmico de farelo de mandioca. **Revista Energia na Agricultura. Botucatu**, vol. 21, n.1, 2006, pag. 34-44.

SALGADO, A.L.; AZZINI, A.; CIARAMELLO, D.; MAQCEDO, E. L. Instruções técnicas sobre o bambu. Campinas, **Instituto Agrônômico**, 43 p, 1992.

SANTI, T. Bambu para toda obra. **Revista mensal de tecnologia em celulose e papel**. Ano LXXVI nº 4, abril 2015.

SANTOS, A. E. S. **Caracterização e Aproveitamento do Rejeito da Indústria de Embutidos para a Produção de Biodiesel**. 2011. 60 f. TCC (Graduação) - Curso de Química Industrial, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SCHULER, V. mensagem pessoal em 7 de outubro de 2016.

SHARIFFA, Y. N.; KARIM, A. A.; FAZILAH, A.; ZAIDUL, I. S. M. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. **Food Hydrocolloids**, v.23, n.2, p.434-440. 2009.

SILVA FILHO, H. A.; BARROS, A. R. M.; SANTOS, E. V. M.; SOUSA, J. T.; VAN HAANDEL, A. C. Seleção de substratos padrões para ensaios respirométricos aeróbios com biomassa de sistemas de lodo ativado. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, 2015.

SILVA, R. M. de C. e. **O Bambu no Brasil e no Mundo**. 2005. Disponível em: <http://www.embambu.com.br/imagens/bambu_brasil_mundo.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2016.

SILVÉRIO, F. O.; BARBOSA, L. C. A.; GOMIDE, J. L.; REIS, F. P.; PILÓ-VELOSO, D. Metodologia de extração e determinação do teor de extrativos em madeiras de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 30, n. 6, p. 1009-1016, 2006.

SILVERSTEIN, R. A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA R. R.; BOYETTE M. D.; OSBORNE, J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton staks. **Bioresource Technology**, v.98, p.3000 - 3011, 2007.

SINCLAIR, G. G.; KRISTIANSEN, B. Fermentation kinetics and modeling. **New York: Taylor e Francis**, 1987.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v.81, n.2, p.219-231. 2003.

SIVERS, M.V.; ZACCHI, G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 43-52, 1995.

SPIRIDON, L.; POPA, V. I.; Hemicelluloses: major sources, properties and applications. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. (Ed.). **Monomers, polymers and composites from renewable resource**. Amsterdam: Elsevier, p.289-304, 2008.

STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BOM, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of Science of Industrial Research**, v.67, p.918- 926, 2008.

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

SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F.; In: **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. Hidrólise do amido. Sao Paulo: Fundação Cargill, v.3, p.377-448, 2003.

TAHERZADEH, M. J. **Ethanol from lignocellulose: Physiological effects of inhibitors and fermentation strategies**. Department of Chemical Reaction Engineering Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden, 1999.

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

TAPPI - **TECHNICAL ASSOCIATION OF PULP AND PAPER INDUSTRY**. Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525°C: T 211 om-97. Atlanta, 1998/1999.

TEIXEIRA, E. K.; RODRIGUES, L. E. R. Etanol: produção em larga escala ou inclusão? **Gestão Contemporânea**, Porto Alegre, v. 11, n. 9, p.113-128, 2012. Semestral. Disponível em: <<http://seer2.fapa.com.br/index.php/arquivo>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

TESTER, R. F. e KARKALAS, J. The Effects of Environmental Conditions on the Structural Features and Physico-chemical Properties of Starches. **Starch - Starke**, v.53, n.10, p.513-519. 2001.

UNEP. Towards sustainable production and use of resources: Assessing Biofuels: **United Nations Environment Programme**. 2009. 120 p.

VAN DER BURGT, Y. E. M.; VLIEGENTHART, J. F. G.; BERGSMA, J.; KAMERLING, J. Structural studies on methylated starch granules. **Starch - Starke**, v.52, n.2-3, p.40-43, 2000.

VAN DIJKEN, J. P. e SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v.32, n.3-4, p.199-224. 1986.

WOLF, L. D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xolooligômeros**. 2011. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos) - Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

WORLD WATCH INSTITUTE. State of the World 2006 Report. **World watch Institute** 2006

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some Recent Advances in Hydrolysis of Biomass in Hot-Compressed Water and Its Comparisons with Other Hydrolysis Methods. **Energy and Fuels**, v.22, p.46–60, 2008.

XIANG, Q. **Conversion of lignocellulosic substrate into chemicals: kinetic study of dilute acid hydrolysis and lignin utilization**. 2002. 163f. Tese (Doutorado) – Universidade de Auburn, Alabama, 2002.

ZHANG, X.; NGUYEN, D.; PAICE, M. G.; TSANG, A.; RENAUD, S. Degradation of wood extractives in thermo-mechanical pulp by soybean lipoxygenase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 866-873, 2007.

[1] http://www.biobrasdiesel.com.br/index.php?option=com_contentview=article&id=76&Itemid=19,4 acesso em 10 de novembro de 2011

[2] <http://veja.abril.com.br/tema/desastre-ambiental-no-golfo-do-mexico>, acesso em 10 de novembro de 2011.

[3] <http://www.biodieselbr.com/Biodiesel/historia/Biodiesel-historia.htm>, acesso em 15 de novembro de 2010.

[4] Fonte: http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_ch/teste_amido.htm, acesso em 23 de maio de 2016.