

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BÁRBARA RIBEIRO ALVES ALENCAR

**OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE VARIEDADES DE PALMA
FORRAGEIRA PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Recife

2018

BÁRBARA RIBEIRO ALVES ALENCAR

**OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE VARIEDADES DE PALMA
FORRAGEIRA PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Valorização de biomassas

Orientador: Profº. Drº. Marcos Antonio de Moraes Júnior

Co-orientador: Profº. Drº. Emmanuel Damilano Dutra

Recife

2018

Catálogo na Fonte
Elaine C Barroso (CRB4/ 1728)

Alencar, Bárbara Ribeiro Alves

Otimização da hidrólise enzimática de variedades de palma forrageira para a produção de bioetanol / Bárbara Ribeiro Alves Alencar. - 2018.

90 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antonio de Moraes

Coorientador: Emmanuel Damilano Dutra

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2018.

Inclui referências e anexo

1. Biocombustível 2. Palma forrageira 3. Caatinga I. Moraes, Marcos Antonio de (orient.) II. Dutra, Emmanuel Damilano (coorient.) III. Título

662.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-462

BÁRBARA RIBEIRO ALVES ALENCAR

**OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE VARIEDADES DE PALMA
FORRAGEIRA PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Marcos Antonio de Moraes Júnior

Co-orientador: Prof^o. Dr^o. Emmanuel Damilano Dutra

Aprovada em: 22/02/2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^o. Dr^o. Marcos Antonio de Moraes Júnior
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr^o. Nelson Medeiros de Lima Filho
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Maria Fernanda Pimentel Avelar
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais, meus avós e ao meu
companheiro

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Aos meus pais, Humberto e Heddy, e ao meu irmão, Victor, pelo apoio e crença em mim durante essa jornada.

Ao meu companheiro, José Netto, por me apoiar e estar sempre ao meu lado.

Aos meus avós paternos, Antônio e Antônia, que apesar da pouca convivência, pode-se dizer que foram muito bons os momentos vividos.

Aos meus avós maternos, Severino e Cleonice, pelo amor e aprendizado diário. É muito bom poder dar esse orgulho a vocês, mesmo que minha avó não esteja mais entre nós.

Aos meus padrinhos, Davson e Elis, e às minhas quase-irmãs, Lidja e Lívia, pelo amor e carinho sempre recíproco.

A toda a minha família, pelos bons e maus momentos.

Aos meus professores do mestrado, por compartilharem parte de vosso conhecimento comigo.

Aos amigos que a ciência me deu: Mariana, Suzyane (e Everton também), Natalie e Karen pelo aprendizado e companheirismo.

Aos meus queridos alunos de iniciação científica, Carolaine, Gabriel, Diego, Giselle e Taune por permitirem que eu compartilhasse um pouco do meu conhecimento com vocês.

Ao meu companheiro do Laboratório da Energia da Biomassa, Raphael, pela parceria e discussões.

Aos técnicos do Laboratório da Energia da Biomassa, pela ajuda e auxílio, sempre que necessário.

Aos meus companheiros do Laboratório de Genética Molecular, por permitirem que eu fizesse parte desse excelente grupo de pesquisa.

Ao professor Rômulo Simões Cezar Menezes por permitir que eu pudesse realizar os experimentos no Laboratório da Energia da Biomassa, durante todo o mestrado.

Ao meu co-orientador, Emmanuel Damilano Dutra, pelas discussões científicas, apoio e por escutar e avaliar se as minhas ideias eram viáveis ou não. Dessa forma, permitiste que eu pudesse fazer o mestrado bem próximo do que imaginei.

Ao meu orientador, Marcos Antonio de Moraes Jr., por ter me aceito como mais um membro do seu grupo de pesquisa, por ter apostado em mim e por todo o aprendizado que pude ter com o senhor.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento do projeto.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelos 2 anos de bolsa.

À Universidade Federal de Pernambuco pela estrutura física e por permitir que um sonho pudesse se tornar realidade.

“People are gonna tell you who you are your whole life. You just gotta puch back and say: “No, this is who I am”. You want people to look at you differently? Make them. You want to change things? You’re gonna have to go out there and change them yourself”.

“There are always people who want you to give up. Never facilitate their work”.

(Kitsis; Horowitz, 2011)

RESUMO

Mudanças climáticas tem provocado o aumento de regiões áridas e semiáridas no mundo. A palma forrageira, vegetal extremamente bem adaptado a essas condições, apresenta-se como uma possível fonte energética, devido ao seu conteúdo de carboidratos fibrosos e baixos teores de lignina e cristalinidade. Nesse contexto, o presente estudo objetiva a otimização da hidrólise enzimática de palma forrageira, com a finalidade de maior formação de carboidratos fermentescíveis. A biomassa vegetal das variedades IPA-Sertânia e Orelha de elefante mexicana foram secadas e caracterizadas, tanto quimicamente quanto fisicamente (DRX, FTIR). As variedades de palma foram submetidas aos ensaios de hidrólise enzimática (48h, 50°C, 150 rpm), com e sem Tween 80 (2,5 g/L), utilizando biomassas sem pré-tratamento químico, pré-tratadas com água e pré-tratadas com H₂SO₄ (1% v/v). Posteriormente, realizou-se um Planejamento composto central rotacional (DCCR) $2^3 + 3(0)$, visando a otimização do sistema. Ocorreram hidrólises enzimáticas da palma fresca, com a carga de 10% e 30% m/v e uma cinética de secagem da biomassa, a 65°C e 105°C. Os hidrolisados foram fermentados durante 8h, a 30°C. Os resultados mostraram que a palma forrageira não necessita de pré-tratamento químico e adição do Tween 80 na hidrólise enzimática. O DCCR informou que as melhores condições de hidrólise foram as do ensaio 6 (30% m/v, 10FPU/g), sem pectinase. Os ensaios demonstraram que se pode produzir volumes de etanol até 1995-12960 L.ha⁻¹.ano⁻¹ (IPA-Sertânia) e 2357-15297 L.ha⁻¹.ano⁻¹ (Orelha de elefante mexicana). Nesse âmbito, pode-se afirmar que a biomassa de palma forrageira é uma boa alternativa para a produção de etanol em regiões com baixa disponibilidade hídrica.

Palavras-chave: Biocombustível. Palma forrageira. Semiárido.

ABSTRACT

Climate change has led to the rise of arid and semi-arid regions in the world. The forage palm, a plant extremely well adapted to these conditions, presents itself as a possible energy source, due to its content of fibrous carbohydrates and low levels of lignin and crystallinity. In this context, the present study aims to optimize the enzymatic hydrolysis of cactus pear, with the purpose of greater formation of fermentable carbohydrates. The biomass of the “IPA-Sertânia” and the “Orelha de elefante mexicana” varieties were dried and characterized, both chemically and physically (XRD, FTIR). The cactus pear varieties were submitted to enzymatic hydrolysis (48h, 50°C, 150 rpm), with and without Tween 80 (2.5 g/L), using biomasses without chemical pretreatment, pretreated with water and pretreated with H₂SO₄ (1% v/v). Subsequently, a Rotacional Central Compound Design (RCCD) 2³ + 3 (0) was carried out, aiming the optimization of the system. Enzymatic hydrolysis of the cactus pear fresh biomass, with 10% and 30% w/v loading and biomass drying kinetics, occurred at 65°C and 105°C. The hydrolysates were fermented for 8 h at 30°C. The results showed that cactus pear does not require pretreatment and addition of Tween 80 in the enzymatic hydrolysis. DCCR reported that the best hydrolysis conditions were those of assay 6 (30% m/v, 10FPU/g), without pectinase. The tests demonstrated that volumes of ethanol can be produced up to 1995-12960 L.ha⁻¹.year⁻¹ (“IPA-Sertânia”) and 2357-15297 L.ha⁻¹.year⁻¹ (“Orelha de elefante mexicana”). In this context, it can be stated that cactus pear biomass is a good alternative for the production of ethanol in regions with poor water availability.

Keywords: Biofuel. Cactus pear. Semiarid.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS	13
1.1.1 Objetivo geral	13
1.1.2 Objetivos específicos.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 PALMA FORRAGEIRA: CULTIVO, PRODUTIVIDADE E COMPOSIÇÃO	14
2.2 PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	21
2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA, COM ALTA CARGA DE SÓLIDOS.....	24
2.4 FERMENTAÇÃO A PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS	27
2.5 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPOSTO CENTRAL.....	28
3 METODOLOGIA	32
3.1 BIOMASSA.....	32
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA SECA DA PALMA FORRAGEIRA	33
3.2.1 Determinação do teor de umidade.....	33
3.2.2 Extrativos	33
3.2.3 Determinação do teor de carboidratos na biomassa lignocelulósica	34
3.2.4 Determinação do teor de lignina.....	35
3.2.5 Determinação do teor de cinzas totais	35
3.3 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA SECA.....	36
3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	37
3.4.1 Atividade enzimática da Celluclast®	37
3.4.2 Atividade enzimática da Polyfruit®	39
3.4.3 Hidrólise enzimática da biomassa seca de palma forrageira	39
3.4.4 Hidrólise enzimática da biomassa fresca e biomassa seca (10% m/v).....	41
3.5 CINÉTICA DE SECAGEM DA BIOMASSA FRESCA DE PALMA FORRAGEIRA	42

3.6 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE PALMA FORRAGEIRA	43
3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	44
4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS DADOS	46
4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE PALMA FORRAGEIRA	46
4.2 INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO E ÁGUA E DA ADIÇÃO DE TWEEN 80 NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PALMA FORRAGEIRA, COM ALTA CARGA DE SÓLIDOS.....	47
4.3 OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA, COM ALTA CARGA DE SÓLIDOS, DE VARIEDADES DE PALMA FORRAGEIRA.....	53
4.4 INFLUÊNCIA DA PECTINASE NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA, COM ALTA CARGA DE SÓLIDOS.....	62
4.5 COMPARAÇÃO ENTRE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA SECA (10% M/V) E FRESCA, DE PALMA FORRAGEIRA	65
4.6 CINÉTICA DE SECAGEM E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA FRESCA DE PALMA FORRAGEIRA (30% M/V).....	68
4.7 COMPARAÇÃO ENTRE A FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO ENZIMÁTICO DA BIOMASSA FRESCA E SECA, DE PALMA FORRAGEIRA, A 30% M/V	69
5 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS.....	73
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA BIORESOURCE TECHNOLOGY	83

1 INTRODUÇÃO

O semiárido brasileiro é uma das regiões secas mais populosas do mundo, o qual detém áreas aptas para o desenvolvimento da agricultura. Um problema crônico dessas regiões é a irregularidade das chuvas e escassez de água, que afeta diretamente a agropecuária e limita o desenvolvimento econômico e social do local. Uma das formas de contornar os problemas econômicos e sociais do semiárido é a valorização da agricultura local, utilizando vegetais como as cactáceas (palma forrageira, por exemplo), que são organismos bastante adaptados ao clima da região. Isso é possibilitado pelo metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), que permite uma alta adaptabilidade à baixa disponibilidade hídrica.

A palma forrageira, cuja apresenta alta produtividade e elevados teores de carboidratos, já é utilizada para diversas finalidades: alimentação de ruminantes e humana, produção de medicamentos, cosméticos, corantes, conservação e recuperação de solos, cercas vivas e paisagismo. Além disso, a sua fração lignocelulósica pode ser usada para a produção de biocombustíveis.

A utilização de biomassa lignocelulósica, para a produção de etanol de segunda geração, apresenta algumas limitações, como o uso de pré-tratamentos, devido à presença da lignina no vegetal, baixa carga de sólidos, alta carga enzimática e suplementação do hidrolisado enzimático na fermentação. Contrariando o cenário atual, o presente trabalho propõe a otimização da hidrólise enzimática, para a produção de etanol nas regiões semiáridas do país. Como elementos, procura-se pela eliminação de etapas, como o pré-tratamento químico, tornando viável a produção desse combustível, a partir da redução de custos do processo e aumento do volume de etanol produzido. O trabalho discursa que isso seria viável a partir da diminuição do tempo de secagem, aumento da carga de sólidos aplicada ao sistema e eliminação da suplementação do hidrolisado enzimático utilizado na fermentação. Deste modo, o trabalho propõe que o aproveitamento energético da palma forrageira poderia resultar em um maior desenvolvimento econômico e social no semiárido brasileiro, a partir da geração de emprego e renda, com a valorização da cadeia produtiva da biomassa local.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Otimizar a hidrólise enzimática, com alta carga de sólidos, de duas variedades de palma forrageira, resistentes à cochonilha do carmim, visando a produção de bioetanol.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar a composição química da biomassa das variedades IPA-Sertânia e Orelha de elefante mexicana de palma forrageira;
- b) Otimizar parâmetros da hidrólise enzimática, para as duas cultivares;
- c) Quantificar os compostos presentes nos hidrolisados enzimáticos destas biomassas;
- d) Determinar o potencial da produção de bioetanol para duas variedades de palma forrageira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PALMA FORRAGEIRA: CULTIVO, PRODUTIVIDADE E COMPOSIÇÃO

A palma forrageira (Figura 3.1) é um vegetal xerófito bastante difundido no interior do nordeste brasileiro. Originária do México (SANGLARD; MELO, 2012), foi introduzida na região pelo empresário alagoano Delmiro Gouveia, no início do século XX, com o objetivo de extrair o carmim, produzido pelo inseto *Dactylopius coccus*, que usa a planta como hospedeiro.

Pertencente à família Cactaceae, o vegetal possui caule do tipo cladódio, popularmente conhecido como raquete, que são achatados e ovais e apresentam modificações foliares do tipo espinho. São plantas do tipo CAM (processo fotossintético conhecido como metabolismo ácido das crassuláceas), que apresentam uma alta resistência aos longos períodos de estiagem e, portanto, são bem adaptadas a ambientes áridos e semiáridos (PINHEIRO et al., 2014). Esse mecanismo de adaptação é caracterizado por uma alta eficiência no uso da água, em virtude da absorção do CO₂, no período noturno, e a transformação deste, em biomassa, pela luz do sol, durante o dia. Essa adaptação, no seu metabolismo, proporciona a este vegetal, a capacidade de poder ser cultivada nas referidas regiões, onde a água é o principal fator limitante ao desenvolvimento da agropecuária (PINHEIRO et al., 2014; QUEIROZ et al., 2015). Além disso, devido a esta característica, elas apresentam uma eficiência até 10 vezes maior, na utilização de água, do que plantas do tipo C4 (vegetais que fixam carbono na forma de oxalacetato), como a cana-de-açúcar. Já em relação a vegetais do tipo C3 (vegetais que fixam carbono na forma do ácido 3-fosfoglicérico), como a soja, essa capacidades pode ser até 20 vezes maior (SAMPAIO, 2005).

Dentre as cultivares resistentes à cochonilha (descritas posteriormente), as variedades Orelha de elefante mexicana e IPA-Sertânia, são aquelas que apresentam a maior eficiência no uso de água, por produção de matéria fresca, em regime sequeiro, com valores em torno de 112,1 e 101,1 kg/ha/mm, em relação à taxa de evaporação real da cultura, respectivamente (MOURA et al., 2014). Em contrapartida, a cana-de-açúcar, sob o mesmo regime, possui uma eficiência de 59,6 kg/ha/mm (OLIVEIRA et al, 2011).



Figura 3. 1. Campos de palma forrageira, no Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) Estação experimental de Caruaru. Fonte: AUTOR, 2017.

O Nordeste brasileiro abriga a maior área plantada com palma forrageira no mundo, correspondendo a cerca de 600 mil hectares (JÚNIOR et al. 2013). Nesta região, são encontradas três principais cultivares de palma: a gigante, a redonda (ambas da espécie *Opuntia ficus-indica*) e a miúda (*Nopalea cochenilifera*) – cuja apresenta a vantagem de ser resistente à cochonilha (SILVA; SANTOS, 2006, VASCONCELOS et al., 2009). Além destas, o Instituto Agronômico de Pernambuco tem desenvolvido outras variedades, que são resistentes a uma das principais pragas dessa cultura (cochonilha do carmim), como os cultivares Orelha de elefante Mexicana e IPA-Sertânia (VASCONCELOS et al., 2009). O desenvolvimento de variedades resistentes às pragas se faz importante, visto que essa cultura é usada como reserva forrageira, sendo significativa, principalmente, na pecuária regional, segmento bastante atingido pela escassez de alimento (SILVA et al., 2014).

A produtividade da palma teve um salto considerável a partir dos anos 2000, no Nordeste brasileiro, com o desenvolvimento de novas formas de cultivo. Os valores que giravam em torno de 161-200t/ha/ano, de massa verde, entre os anos de 1998 e 2000 (LIRA et al., 2005), passaram a 400 t/ha/ano (massa fresca), para a variedade gigante, considerando a forma adensada de cultivo, com 80.000 mudas/ha. Para as cultivares redonda e miúda, na mesma densidade de plantio, os

valores podem atingir a produtividade de 518 e 639 t/ha/ano, de massa fresca, respectivamente (SILVA et al., 2014).

Além dos fatores cultivo e produtividade, a composição da biomassa, se faz importante, pois ela é um agente limitador na seleção do tipo de material lignocelulósico que servirá como substrato para o processo fermentativo. Como toda biomassa vegetal, a palma também apresenta teores de celulose, hemicelulose e lignina.

O homopolímero linear celulolítico é constituído por unidades de β -D-glicanopiranosil, unidas por ligações do tipo β -1,4, sendo a celobiose a unidade de repetição (HU; RAGAUSKAS, 2012). Essa celobiose é, quimicamente, um dímero de glicose (monossacarídeo fundamental para o processo fermentativo), provocada pela não quebra de todas as ligações β -1,4 presentes na celulose, que são responsáveis pela estruturação desse carboidrato. A celulose apresenta-se em microfibrilas de aproximadamente 2-10nm (DING; HIMMEL, 2006), em duas conformações (Figura 3.2): uma cristalina e outra amorfa. A formação da estrutura cristalina é decorrente da união de 30-36 cadeias de glucanos, agregados lateralmente por interações de hidrogênio e Van der Waals (SOMERVILLE, 2004), tornando esta região impermeável, já que as ligações de hidrogênio fortalecem as cadeias de celulose, promovendo a agregação na estrutura cristalina (PU et al., 2008). Portanto, não só os teores de celulose, como também o percentual do tipo de celulose, que está presente nesse material lignocelulósico, torna-se um agente limitador, para a obtenção do carboidrato de interesse – a glicose. Isso ocorre, pois, quanto maior o nível de cristalinidade, mais compactadas estão as microfibrilas e, portanto se torna mais difícil o acesso das celulasas à matriz celulolítica total.

Nessas condições, o grupo de enzimas interage quase que exclusivamente com a porção amorfa da cadeia (ARANTES; SADDLER, 2010), que se caracteriza por ser uma região menos ordenada de fibras, sendo esta decorrente da má formação da estrutura cristalina (PARK et al., 2010).

Alguns pesquisadores sugerem que, além destas duas regiões, existe outra porção denominada celulose para-cristalina, que possui características semelhantes à da estrutura amorfa (STEPHENS et al., 2008), sendo esta menos ordenada que a

estrutura cristalina, porém mais ordenada que a porção amorfa (PU; ZIEMER; RAGAUSKAS, 2006).

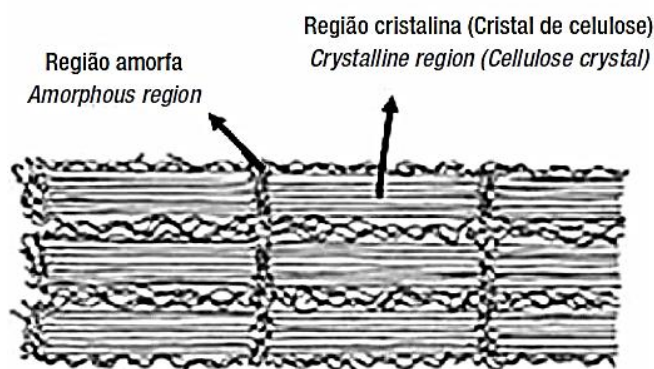


Figura 3. 2. Ilustração das regiões cristalinas e amorfas que compõem a estrutura das microfibrilas de celulose. Fonte: Adaptada de KVIEN; TANEN; OKSMAN (2005).

Apesar de a glicose ser a principal molécula de interesse, quando se refere a etanol celulósico, a biomassa lignocelulósica também apresenta potencial bioenergético a partir de outras porções de sua composição, como a hemicelulose, que é rica, principalmente, no referido hidrato de carbono citado acima: a xilose (PU et al., 2008).

Além da xilose, a hemicelulose apresenta em sua composição o xiloglicano, as galactoglicomananas, a arabinoglicuronoxilana, a xilana, o glucuronoxilano, o arabinoxilano, a manana e a glucomanana (PU et al., 2008), que serão, após o processo de hidrólise, quer ácida, quer enzimática, apresentados na forma de monossacarídeos como arabinose, manose e galactose (HU; RAGAUSKAS, 2012). O heteropolímero também apresenta como vantagem o fato de toda a sua estrutura ser amorfa, com polímeros de cadeia lateral curta, além de ser hidrofílica, o que facilita a liberação dos seus carboidratos constituintes para o meio reacional, sendo assim mais facilmente removida da estrutura quando comparada com a celulose (GÍRIO et al., 2010; PENG et al., 2012; HU; RAGAUSKAS, 2012; GAO; KUMAR; WYMAN, 2014).

Além da celulose e da hemicelulose, a biomassa apresenta outra porção: a pectina. Ela é uma estrutura polissacarídica presente na parede celular primária do vegetal, que pode se apresentar em diferentes constituições, dependendo do grau de maturidade do vegetal (CALLIARI, 2004), podendo se apresentar na conformação linear e/ou ramificada (Figura 3.3).

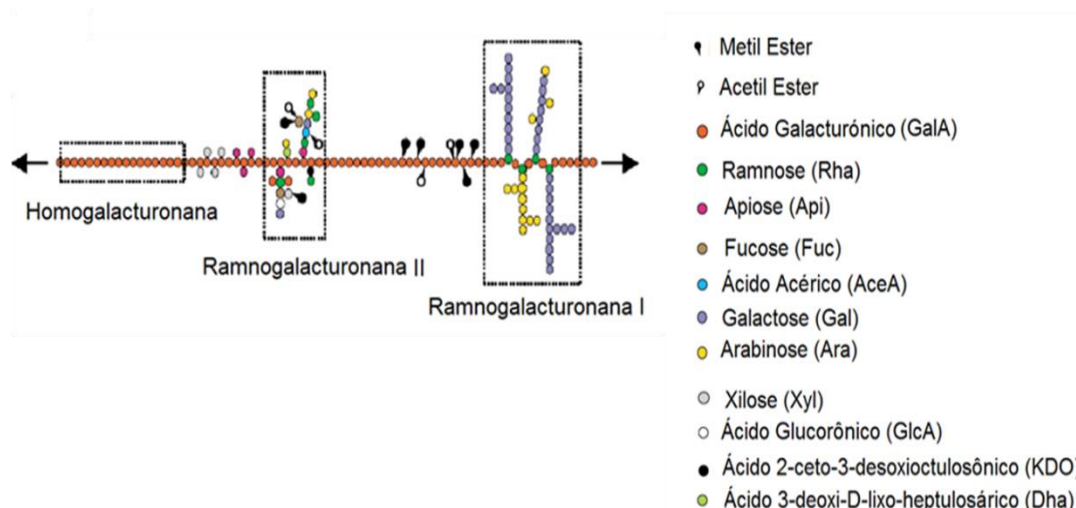


Figura 3.3. Representação esquemática das conformações estruturais da pectina (Homogalacturonana e Ramnogalacturonana I e II). Fonte: Adaptada de WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006.

A estrutura linear da pectina é formada por 150 a 500 unidades repetidas de ácido galacturônico, unidos por ligações glicosídicas, do tipo α -1,4, que podem estar parcialmente esterificados, motivo pelo qual são mais resistentes à hidrólise. Essa região é denominada de homogalacturonana (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

Já a estrutura ramificada pode variar em relação à sua composição. A ramnogalacturonana I, um dos tipos de ramificação, é o segundo polissacarídeo mais importante das pectinas e sua cadeia principal está composta da repetição de ácido galacturônico e ramnose. Ela possui cadeias laterais formadas por diferentes carboidratos, como arabinanas e galactanas. Já a ramnogalacturonana II, é um polissacarídeo péctico complexo, que apresenta baixa massa molar, e é formado por ácido galacturônico, ramnose, galactose e alguns açúcares mais raros, como apiose

(GULFI; ARRIGONI; AMADÒ, 2007; PINHEIRO, 2007; BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015). Ou seja, a hidrólise dessa porção da biomassa, que também é rica em carboidratos, possibilita a liberação de monossacarídeos, para o meio reacional, com potencial fermentativo.

Quando unida à celulose e à hemicelulose, a pectina forma uma estrutura denominada de protopectina, conforme ilustrado na Figura 3.4 (PENNA, 2002).

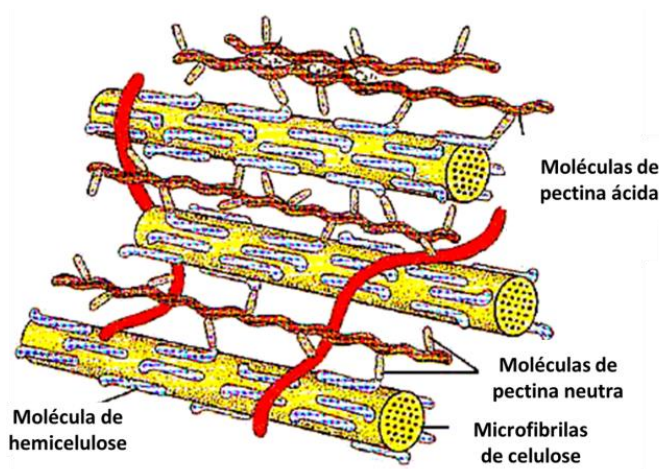


Figura 3.4. Estrutura da protopectina, evidenciando as porções celulósicas, hemicelulósicas e pecticas, na parede celular vegetal. Fonte: Adaptada de ENZIMAS COMERCIAIS (2016).

A lignina, apesar de não ser um composto passível de fermentação, é um dos principais responsáveis pelo acréscimo de mais uma etapa no processo, denominada de pré-tratamento (assunto que será abordado no item 3.3). Isso ocorre porque ela diminui a interação da enzima com a celulose, por ser uma barreira física que impede o acesso dessas proteínas à matriz celulósica. Essa situação desencadeia a necessidade do uso de uma maior carga enzimática no sistema, para se tentar atingir uma mesma eficiência de hidrólise, o que, ainda assim, nem sempre é possível (WU; HUANG; SHIH, 2014). Portanto, buscar alternativas, em biomassas com menores teores lignina, também se faz necessário.

Os percentuais desses componentes tendem a variar, entre os cultivares de palma forrageira, bem como, quando comparados a outros tipos de biomassa. A

Tabela 3.1 apresenta os teores dos referidos compostos, além dos percentuais de cinzas e extrativos.

Os valores descritos sugerem que a palma forrageira é a que apresenta o menor valor de carboidratos (48,7%) e de lignina (10,3%), dentre as biomassas descritas abaixo, considerando que os teores desse componente são subestimados na caracterização de Van Soest, Robertson e Lewis (1991), realizada para sorgo sacarino. Isso é uma limitação da própria metodologia. Porém, devido à facilidade de plantio da palma, no que se refere à disponibilidade de água – um dos principais problemas do sertão nordestino – esse vegetal, tão difundido na região, apresenta-se como biomassa potencial para a produção de biocombustível.

Tabela 3. 1. Comparação da composição lignocelulósica, extrativos e cinzas de biomassas usadas para, ou com potencial energético. Fontes: WEISS; FARMER; SCHELL (2010), BIZZO et al. (2014), SOUZA FILHO et al. (2016), REIS et al.(2016).

Compostos	Bagaço de cana-de-açúcar (BIZZO et al., 2014)	Sorgo sacarino (REIS et al., 2016)	Palha de milho (WEISS; FARMER; SCHELL, 2010)	Palma forrageira – <i>Nopolea cochenillifera</i> (SOUZA FILHO et al., 2016)
Celulose (%)	35,3	42,5	35,5	31,6
Hemicelulose (%)	24,0	38,0	18,6	17,1
Lignina (%)	22,9	4,0*	14,2	10,3
Cinzas (%)	Ni	1,1	3,0	5,4
Extrativos (%)	14,7	11,7	11,3	26,9

Ni – Não informado; *Lignina detergente ácido (ADL).

O uso de biomassa lignocelulósica regional é de suma importância para a redução nos custos de produção de biocompostos, fator bastante determinante na geração de qualquer produto (SANTOS et al., 2011). Características como alta conversão de carboidratos em monômeros fermentescíveis (CUSHMAN et al., 2015), assim como tolerância à seca e redução de exigências de fertilizantes, são

importantes na escolha da biomassa a ser utilizada (WYMAN, 2007). A palma forrageira apresenta, como seus principais atributos, sua vasta disponibilidade, ausência de entressafra (pelo fato de ser um vegetal perene), baixa necessidade de tecnologia para cultivo, baixo teor de lignina e alto conteúdo de celulose amorfa (YANG et al. 2015), o que diminui a necessidade de pré-tratamentos agressivos. Outro fator que confere vantagem à utilização de palma é o fato dela ser uma cultura bastante difundida, altamente resistente à seca e de fácil plantio (NETO, 2010), convertendo-a, portanto, em uma matéria-prima potencial para produção de bioprodutos.

Santos et al. (2016) ressaltam que, apesar da estimativa da produção de etanol, nas condições testadas, para as três variedades de palma (1490-1875 L/ha.ano⁻¹), ser inferior às encontradas em cana-de-açúcar (5300-9400 L/ha.ano⁻¹) e beterraba sacarina (5000-6000 L/ha.ano⁻¹), a cactácea apresenta a vantagem de poder ser cultivada em regiões áridas e semiáridas, fator importante, dadas as condições de escassez hídrica neste locais.

2.2 PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

A etapa de pré-tratamento é realizada para facilitar o acesso enzimático, principalmente, à matriz celulósica. Portanto, pré-tratamentos são utilizados para modificar a estrutura da biomassa lignocelulósica (Figura 3.5), removendo a parede celular, causando a dissociação de biomacromoléculas (ZHANG; YUAN; CHENG, 2017).

Essa etapa do processo deve apresentar baixo custo operacional, resultando na recuperação da maioria dos componentes lignocelulósicos, na forma utilizável e em frações separadas, produzindo o mínimo ou nenhuma quantidade de carboidratos inibidores e produtos de degradação (CHANDRA et al., 2007). Ou seja, a maior parte dos carboidratos passíveis de fermentação deve permanecer na fração sólida, já que a perda destes, na fração líquida, acarreta na diminuição do potencial energético, por parte da biomassa pré-tratada, diminuindo os seus rendimentos em etanol. Caso os pré-tratamentos provoquem uma alta remoção de carboidratos, há a

possibilidade de utilizar essa fração na fermentação, porém um custo adicional de reagentes teria que ser utilizado para correção do pH, por exemplo.

A avaliação dos pré-tratamentos de biomassa depende de um parâmetro chamado fator de severidade, que é definido como a interação dos efeitos temperatura, acidez e tempo de pré-tratamento, sendo ela conduzida a analisar os carboidratos (monômeros e oligômeros) presentes no líquido e a quantidade de carboidratos insolúveis em água, após o pré-tratamento (AGBOR et al., 2011).

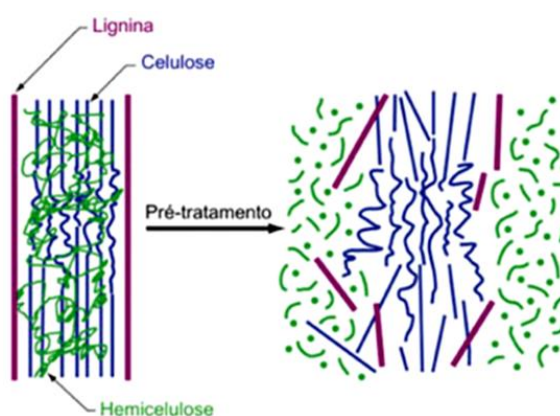


Figura 3. 5. Esquema geral das alterações, causadas na estrutura lignocelulósica, após o pré-tratamento. Fonte: KONDO (1997).

Os tipos de pré-tratamentos mais utilizados são os físicos e químicos (MOSIER et al., 2005). Tratamentos físicos tem, por finalidade, reduzir o tamanho das partículas e a cristalinidade da celulose, aumentando, assim, a superfície de contato, quando esta biomassa for exposta ao ataque de compostos químicos ou enzimáticos (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Moagem e explosão a vapor são exemplos e a literatura já demonstrou a eficiência destes tratamentos, seja atuando sozinhos ou, principalmente, combinados com soluções (RABELO et al., 2012; MILÉO; KATARIA et al., 2016), porém, eles apresentam algumas limitações. A moagem, apesar de provocar a diminuição do tamanho das partículas e não formar inibidores, apresenta alto custo energético, tornando-o um tipo de pré-tratamento economicamente inviável (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Já a explosão a vapor exige o uso de altas temperaturas, provocando a solubilização da hemicelulose e da

lignina. Contudo, a maior parte da lignina ainda permanece nos resíduos sólidos pré-tratados, podendo resultar na adsorção não produtiva da enzima, além de que, em condições mais severas, pode haver a degradação da celulose, diminuindo o conteúdo deste carboidrato nos resíduos sólidos (MEDINA et al., 2016; MONSCHEIN; NIDETZKY, 2016).

Alguns compostos ácidos e alcalinos também têm sido usados em pré-tratamentos. Soluções de NaOH, KOH, H_2O_2 (com pH corrigido para 11,5) e $Ca(OH)_2$ são utilizadas por provocarem inchaço na biomassa e diminuir a cristalinidade da celulose, além de desestruturar a lignina e romper as suas ligações com os outros carboidratos, tornando-os mais acessíveis (AGBOR et al., 2011). Porém, recentes trabalhos tem demonstrado o oposto, em relação à cristalinidade (BINOD et al., 2012; CHANDEL et al., 2014; KASSAYE; PANT; JAIN, 2017). Normalmente, o uso dessas soluções exige altas concentrações, o que o torna ecológico-economicamente inviável (AGBOR et al., 2011). Sob a mesma justificativa está o uso de soluções concentradas de H_2SO_4 , HCl e H_3PO_4 , além de serem corrosivas. Porém, o uso das mesmas, em baixas concentrações já se mostrou eficiente (RAJAN; CARRIER, 2014), convertendo-se, assim, numa alternativa para pré-tratamentos. Alvira et al. (2010) afirmam que o uso de soluções de ácido diluído são as mais indicadas para pré-tratamentos, já que possuem eficácia em vários tipos de substratos lignocelulósicos.

Porém, apesar do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica fornecer as vantagens acima citadas, ele é um dos principais responsáveis pelo aumento do custo no processo de produção de biocombustível (ALVIRA et al., 2010). A presença dessa etapa, na produção de bioetanol, pode representar um aumento de 16-30% no custo da produção de bioetanol, considerando os custos capitais (equipamentos), os diretos (instalação, tubulação, elétrica, reagentes) e os indiretos (honorários dos contratantes e os custos de contingência), nos valores totais do processo (HUMBIRD et al., 2011). Portanto, a remoção desta etapa, acarreta em uma diminuição significativa no custo total da produção de biocombustível, a partir de biomassa lignocelulósica.

Outro fator que deve ser ressaltado é que a necessidade de pré-tratamento, está relacionada, principalmente, a dois fatores: percentual de lignina da biomassa e

índice de cristalinidade da celulose. Porque, se o pré-tratamento tem, como uma de suas funções, remover a lignina e promover o inchaço da celulose cristalina, como modo de aumentar os teores de conversão de celulose; Se os percentuais dessas duas porções da biomassa estiverem reduzidos, menor a severidade, e, por conseguinte, menor a necessidade de realização desta etapa. Portanto, pode-se afirmar que, dependendo da biomassa utilizada como substrato, para a obtenção de carboidratos, pode não haver a necessidade da realização de pré-tratamento.

2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA, COM ALTA CARGA DE SÓLIDOS

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos tem sido um dos métodos mais utilizados para a conversão de carboidratos fibrosos, como celulose e hemicelulose, em monossacarídeos passíveis de fermentação (WAGHMARE et al., 2014; ROCHA et al., 2016; HASHMI et al., 2017). A escolha desse tipo de hidrólise se dá pelas condições das reações serem mais suaves, com alta especificidade, maior rendimento do produto, menores efeitos colaterais e energia (AL-ZUHAIR, 2008; MARQUES et al., 2008). Além disso, ela possui uma análise de custo utilitário (CUA) muito menor, em comparação a outros métodos, como hidrólises ácidas (SUBHEDAR; BABU; GOGATE, 2015). Esse tipo de análise é semelhante à de custo-benefício, porém é mais ampla, devido considerar os benefícios para a sociedade (ASKDRBIRD, 2015), já que soluções ácidas e alcalinas concentradas são muito prejudiciais ao ambiente, pois podem ser levadas a rios e solos, afetando as populações ali viventes.

A fração celulósica da biomassa será atingida por um grupo de enzimas denominadas celulasas e estas podem atuar, principalmente, em dois pontos da cadeia (Figura 3.6): Na ligação glicosídica (entre dois monômeros de celobiose, caracterizando-se como exo-glucanases) e em regiões amorfas internas da cadeia – endoglucanases. Além destas, as β -glucosidases clivam a celobiose, liberando monômeros de glicose (GALBE; ZACCHI, 2002). A última pode ser inibida pela presença de seu produto. Xiao et al. (2004) observaram que quando adicionado 100g/L de glicose em uma carga de sólidos celulósicos de 10%, houve 50% de

inibição da atividade da β -glucosidase. Uma alternativa pode ser a realização da hidrólise em conjunto com o processo fermentativo, etapa denominada de fermentação e sacarificação simultâneas (SSF). Além disso, na hidrólise enzimática de material lignocelulósico, as enzimas tendem a ter afinidade com a lignina, provocando uma associação improdutiva, situação que pode ser amenizada pelo uso de agentes tensoativos, como surfactantes, podendo, assim, aumentar a eficiência da hidrólise (ERIKSSON; BÖRJESSON; TJERNELD, 2002; KUMAR; WYMAN, 2009; LIN et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

A Celluclast 1,5L (Novozyme) é um dos complexos enzimáticos mais usados, sendo produzida a partir do *Trichoderma reesei* (GIL et al., 2015). Esse micro-organismo produz 5 tipos de endoglucanase, 2 de celobiohidrolase e 2 de β -glucosidase.

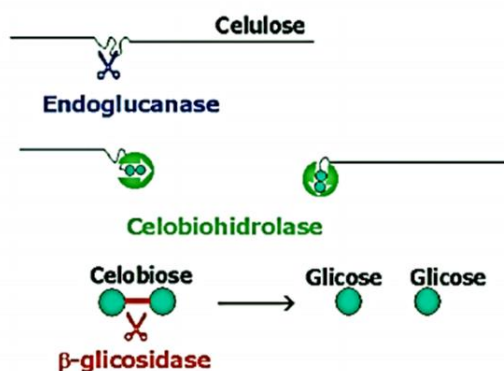


Figura 3. 6. Representação esquemática da ação enzimática na estrutura celulósica. Fonte: OGEDA et al. (2010).

Pectinases é um grupo de enzimas responsáveis por hidrolisar a estrutura pectica dos vegetais e a classificação de cada uma delas depende da região de ataque do esqueleto galacturônico. Existem, basicamente, três grupos de enzimas: a pectina esterase (desesterificante ou desmetoxilante) que remove os grupos metil-éster; as despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases), que catalisam a clivagem das ligações glicosídicas, e, as protopectinases que solubilizam protopectina, formando a pectina (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Além disso, elas podem atuar como tensoativos, por terem a capacidade de diminuir a viscosidade do meio, melhorando assim, a eficiência de hidrólise (BHAT, 2000).

Apesar destas vantagens, a hidrólise enzimática ainda é limitada por algumas dificuldades técnicas e econômicas. Como forma de minimizar estes fatores, podem-se utilizar estratégias como aumento da carga de substrato, diminuição da carga enzimática, redução do tempo de hidrólise e a busca por enzimas mais eficientes (OUYANG et al., 2013).

Dentro desse contexto, a realização de hidrólises enzimáticas com alta carga de sólidos, que é caracterizada pela diminuição ou eliminação da água presente na “polpa lignocelulósica”, ou o teor da carga de sólidos $\geq 15\%$ m/m, tem sido uma boa alternativa (HODGE et al., 2009; MODENBACH; NOKES, 2013). O aumento na carga de substrato se dá com a finalidade de obter, ao final desta etapa do processo, maiores concentrações de carboidratos no hidrolisado final (WANG; TEMPLER; MURPHY, 2012; PURI; HEAVEN; BANKS, 2013). Nesse tipo de hidrólise, a carga de sólidos sugerida, para que o sistema seja rentável, ou seja, que apresente concentração de etanol $\geq 4\%$ v/v, é $\geq 20\%$ m/m (LARSEN et al., 2008). Porém, se forem considerados os teores de hemicelulose, os valores desta carga de sólidos podem diminuir. Outra vantagem é a redução de custo capital e de produção, ao utilizar equipamentos menores que estarão produzindo rendimentos semelhantes, em comparação às hidrólises de cargas menores de biomassa, além da redução do uso de água, o que também provoca a redução do custo de tratamento e destinação da mesma (UM; HANLEY, 2008; BANERJEE et al., 2010; MODENBACH; NOKES, 2013).

A redução da água nessa etapa do processo implica em algumas outras limitações, já que este solvente é responsável por aumentar a eficiência das reações enzimáticas, reduzindo a viscosidade da pasta, devido ao aumento da lubrificação das partículas (MODENBACH; NOKES, 2013). O uso de cargas de sólidos superiores a 20% m/m, deixa pouca água livre no sistema (HODGE et al., 2009), o que impede a solubilização da enzima e, por conseguinte, diminui a interação desta para com o seu substrato. Além disso, o uso de altas cargas de sólidos pode afetar a homogeneização da mistura e também inibir a enzima, com o aumento da concentração de glicose, durante o processo (PURI; HEAVEN; BANKS, 2013).

Considerando que a palma forrageira já apresentou boas conversões de celulose, a partir da hidrólise enzimática, obtendo 30 g/L de glicose e 82,8% de conversão (10% m/v e 20 FPU/g de biomassa), e que a partir da hidrólise, com altas cargas de sólidos (SOUZA FILHO et al., 2016), é possível obter altas concentrações de carboidratos, a opção por utilizar esse método hidrolítico se faz acertada. Porém, esse tipo de hidrólise também apresenta desvantagens e, por tais limitações, faz-se necessária a otimização desse sistema, de forma que o mesmo possibilite os maiores rendimentos de conversão de carboidratos possíveis, diminuindo a interferência de fatores como pouca disponibilidade de água, e conseguinte fluidez do meio, além da inibição enzimática.

2.4 FERMENTAÇÃO A PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS

Os hidrolisados ricos em carboidratos na forma fermentescível, provenientes de reações de hidrólise, quer ácidas, quer enzimáticas, podem ser direcionados à produção de etanol. Estequiometricamente, a cada mol de glicose, são gerados 2 mols de etanol, cujo rendimento máximo, referente à razão entre a massa molar do etanol e glicose, é 0,511.

A produção de etanol, a partir de diferentes biomassas e micro-organismos, vem sendo largamente estudada (ELIANA et al., 2014; RABELO et al., 2014; TOQUERO; BOLADO, 2014; HUANG et al., 2015; ALENCAR et al., 2017b). Portanto, é possível observar que fatores como tipo de substrato, espécie e linhagem do micro-organismo, assim como os nutrientes, podem afetar a produtividade etanólica.

Recente estudo avaliou a influência dos íons Cu^{2+} e Mg^{2+} na fermentação do caldo de cana-de-açúcar, sendo observado efeito antagônico para ambos. Enquanto o Mg^{2+} aumentou os rendimentos da produção de etanol a 0,45 g/g, o Cu^{2+} diminuiu esse valor para 0,35 g/g. Além disso, os autores afirmaram que a concentração de Mg^{2+} é o parâmetro mais importante para o sucesso na produção de etanol

combustível, a partir desse mosto, e que, portanto, a concentração do mesmo deve ser mantida acima de 600 mg/L (DE SOUZA et al., 2015).

A levedura mais comumente utilizada no processo é a *Saccharomyces cerevisiae*, já que ela apresenta como vantagens alta eficiência fermentativa, alta capacidade de competição e sobrevivência no ambiente industrial (ANDRIETTA et al., 2007). Porém, cepas industriais desse micro-organismo não possuem a capacidade de fermentar outros carboidratos, como a xilose, que também está presente nesse tipo de hidrolisado. Como forma de contornar esse obstáculo, estudos tem sido desenvolvidos com a finalidade de fermentar ou co-fermentar a fração C5 (SURIYACHAI et al., 2013; YANG et al., 2015). Isso se tornou viável a partir da utilização de outros micro-organismos, como *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731 e *Scheffersomyces stipitis*.

Além destes, recentemente foi isolada, do trato gastrointestinal de um besouro, a levedura *Spathaspora passalidarum*, que apresenta a capacidade de co-fermentar carboidratos além da glicose, como xilose e celobiose, diminuindo, por exemplo, a necessidade da utilização de β -glucosidase (sua função foi discutida anteriormente no item 3.3) na etapa de hidrólise enzimática (NGUYEN et al., 2006; LONG et al., 2012). Portanto, a identificação dessa levedura abre como alternativa a possibilidade da diminuição do tempo de fermentação, a partir da estratégia de co-fermentação, entre *S. cerevisiae* e *S. passalidarum*, devido a acelerar o consumo de glicose, diminuindo o tempo para iniciar a rota de metabolização de outros carboidratos pela nova levedura. Isso pode ocorrer, pois ela, primeiramente, consome a glicose, para, posteriormente, iniciar a assimilação da xilose e celobiose, presentes no meio (LONG et al., 2012).

Além desses fatores, o consumo de outros carboidratos potencializa a capacidade energética da biomassa lignocelulósica, para a produção de bioetanol, já que eles também estarão servindo como substratos para o processo.

2.5 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPOSTO CENTRAL

Planejar experimentos é definir uma sequência de coletas de dados experimentais para atingir determinados objetivos. Dentre os métodos de planejamento experimental disponíveis na literatura, o planejamento fatorial é o mais indicado quando se deseja estudar os efeitos de duas ou mais variáveis de influência. Os experimentos devem abranger todas as combinações possíveis dos níveis de cada variável são investigadas (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Desta forma é possível estimar efeitos de interação entre as variáveis.

A finalidade do planejamento fatorial é a otimização e, para tal, ele apresenta algumas características: (1) redução do número de ensaios sem prejuízo à qualidade da informação, (2) estudo simultâneo de diversas variáveis, separando seus efeitos, (3) seleção das variáveis que influenciam um processo, com número reduzido de ensaios, (4) a representação do processo estudado através de expressões matemáticas e (5) geração de superfícies de resposta, indicando de que modo os níveis interferem no resultado final (CONAGIN, 1982; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Os planejamentos fatoriais mais simples envolvem apenas a avaliação de 2 níveis para cada variável (+1; -1). Eles devem ser realizados, no mínimo, em duplicata e a determinação do número total de experimentos é por 2^k , onde k corresponde ao número de parâmetros estudados. Uma análise mais precisa do sistema requer a utilização dos pontos centrais, cujos valores são determinados a partir da média aritmética dos valores dos níveis superiores (+1) e inferiores (-1), e são codificados pelo 0 (zero). A presença do ponto central, que deve ser realizado, no mínimo, em duplicata, diminui a necessidade de realizar todo o planejamento em replicatas. Porém, se a finalidade é uma análise mais ampla e completa do sistema, o mais indicado é o uso do planejamento fatorial composto rotacional (DCCR). Neste, além dos pontos colaterais e centrais, são estudados os axiais, que são codificados pelo valor de α , o qual é determinado por $\pm \sqrt{k}$, conferindo ao delineamento a propriedade de ser rotacional. Essa característica propicia variâncias idênticas para pontos situados à mesma distância do centro, em qualquer direção. (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

O uso de planejamentos fatoriais tem sido bastante utilizado nos últimos anos, para as mais diversas finalidades. Foi avaliada a influência dos fatores tempo (60,

180, 300 minutos), temperatura (45, 50, 55 °C) e carga de pectinase (5, 17,5, 30 PECTU/g mesh), no pré-tratamento de lentilha d'água (*Landoltia punctata*), para a produção de bioetanol, num planejamento 2^3 , com triplicata no ponto central (CHEN et al., 2012). A partir dos rendimentos de glicose observados, Chen et al. (2012) concluíram que as condições ótimas são correspondentes ao nível inferior da temperatura, ao superior do tempo e a carga de pectinase no valor de 26,54 PECTU/g mesh, cujo valor foi determinado a partir de um software.

Estudando a palha de cana-de-açúcar, Santos et al. (2014) analisaram a influência dos fatores temperatura (170, 190, 210 °C), tempo (5, 10, 15 min) e carga de biomassa (10, 12,5, 15 % m/v), no pré-tratamento, para uma maior conversão de celulose em glicose. O planejamento composto central rotacional (DCCR) realizado teve 6 replicatas no ponto central e um total de 20 ensaios. Neste estudo, observou-se que os maiores rendimentos de glicose (%) foram para as temperaturas de 190°C e 210°C.

Langaro et al. (2015) testaram as variáveis concentração de substrato (X_1 = 10, 20, 30 g/L), concentração de extrato enzimático na hidrólise (X_2 = 5,5, 11,0, 16,6 %v/v), temperatura (X_3 = 40, 50, 60 °C), pH da solução tampão utilizada (X_4 = 4, 5, 6), tempo de incubação de hidrólise (X_5 = 30, 60, 90 min e agitação (X_6 = 0, 5, 10 min), investigando a influência dos mesmos na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar, por enzimas fúngicas (*Trichoderma sp.* e *A. niger*), na obtenção de açúcares redutores. Os melhores resultados foram obtidos a partir das condições realizadas nos pontos centrais, para a enzima proveniente do *Trichoderma sp.*, com concentração de açúcares redutores (AR) de 0,112 g/L. Para a enzima do *A. niger*, a maior concentração de AR foi 0,095 g/L, com os fatores temperatura e agitação nos níveis inferiores, e os demais nos superiores.

3 METODOLOGIA

O presente trabalho será desenvolvido em acordo com as etapas posteriormente descritas. Os procedimentos referentes à biomassa foram realizados para as variedades Orelha de elefante mexicana (*Opuntia ficus-indica*) e IPA-Sertânia (*Nopalea cochenillifera*). A representação geral das etapas desta seção estão apresentados na Figura 4.1.

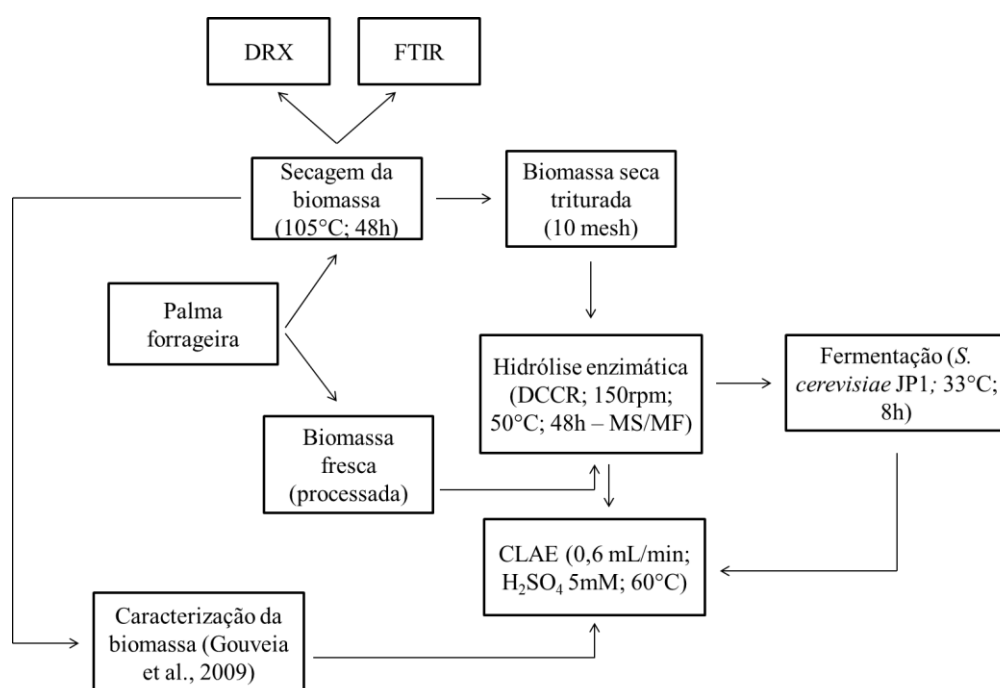


Figura 4. 1. Fluxograma referente às principais etapas desenvolvidas na seção Material e Métodos.

Fonte: AUTOR, 2018. MS – Biomassa seca; MF – Biomassa fresca.

3.1 BIOMASSA

As variedades de palma forrageira (Orelha de elefante mexicana - *Opuntia ficus-indica*; IPA-Sertânia - *Nopalea cochenillifera*) foram fornecidas pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA – Caruaru – PE - Brasil). Os cladódios foram lavados, com água destilada, para retirada de solo e impurezas, e cortados em cubos. Parte deles foi seco em estufa, a 105°C, durante 48h e, posteriormente, os

mesmos foram triturados em moinho de facas e peneirados a uma granulometria de 10 mesh (2 mm). A porção não secada foi processada em liquidificador industrial e mantida a 4°C, por até 5 dias.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA SECA DA PALMA FORRAGEIRA

A caracterização química das variedades de palma forrageira foi realizada segundo Gouveia et al. (2009).

3.2.1 Determinação do teor de umidade

Com o objetivo de determinar o teor de umidade (Equação 1) na biomassa lignocelulósica, foram pesados aproximadamente 2g de biomassa úmida, em balança com infravermelho. O procedimento foi repetido 3 vezes.

$$U (\%) = \frac{Mu - Ms}{Mu} * 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde $U (\%)$ corresponde ao teor de umidade presente na biomassa, Mu corresponde a massa de biomassa úmida e Ms ao valor de biomassa seca fornecido pelo equipamento.

3.2.2 Extrativos

O percentual de extrativos (Equação 2) também foi determinado para a palma forrageira. Para tal, foram pesados 5g de biomassa seca, e triturada, em cartucho de papel de filtro qualitativo (14 x 4 cm), devidamente tarado. O conjunto foi fechado

com tampão de algodão e foi transferido para o tubo de extração do equipamento Soxhlet.

Para o balão de fundo chato (500 mL), foi transferido 250 mL de solução alcoólica 95% (v/v) e a mesma foi utilizada como solução extratora, sendo realizadas, com ela, sucessivas lavagens do material lignocelulósico, para retirada dos extrativos. Este procedimento durou 8h, à temperatura de 78°C e foi realizado em triplicata.

$$E(\%) = \frac{M_{ce} - M_{se}}{M_{ce}} * 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde $E(\%)$ corresponde ao percentual de extrativos na biomassa, M_{ce} corresponde ao valor da massa inicial, ou seja, aquela que ainda não sofreu extração e M_{se} corresponde à massa remanescente do processo.

3.2.3 Determinação do teor de carboidratos na biomassa lignocelulósica

Para se conhecer o conteúdo de carboidratos na porção fibrosa da biomassa, é necessário desestruturar essa fração a partir da hidrólise ácida, com H_2SO_4 (72 % v/v). Para que isso aconteça, foram pesados 1g de biomassa, sem extrativos, em béquer de 50 mL. Após isso, houve a transferência de 6,5 mL, da referida solução ácida, para a vidraria que continha a biomassa. A palma forrageira, sem extrativos, foi homogeneizada na solução, com o auxílio de um bastão de vidro, e o conjunto (béquer, biomassa e solução ácida) foi levado ao banho-maria, na temperatura de 45°C, durante 7 minutos, sob agitação manual. Ao final desta etapa, a reação foi parada pela adição de 25 mL de água destilada ao béquer e o conteúdo da vidraria foi transferido para um erlenmeyer (250 mL). O béquer e o bastão ainda foram lavados com 112 mL de água destilada e esta foi transferida para o mesmo erlenmeyer de 250 mL. Este erlenmeyer foi autoclavado por 30 minutos, a 121°C, a 1,5 kgf/cm², para completar a reação. Após o referido tempo, o conjunto foi resfriado

à temperatura ambiente e o conteúdo foi filtrado em papel de filtro quantitativo, faixa preta (Whatman®, referência 41, porosidade 20-25 micra), devidamente tarado, e a fração líquida foi coletada em balão volumétrico (250 mL). Foi acrescentado, ao sistema, um volume de água destilada necessário para aferir o menisco da vidraria. Após isso, foram coletadas amostras e as mesmas foram armazenadas em frascos âmbar (100 mL) e congeladas em freezer para posteriormente serem analisadas por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.4 Determinação do teor de lignina

A fração sólida remanescente no papel de filtro, fruto da hidrólise ácida (item 4.2.3), foi lavada, com água destilada, até pH neutro e o conjunto (biomassa e papel de filtro) foi seco, em estufa, à 65°C, por 24h. Após a secagem, o material foi dessecado e pesado, para a determinação do percentual de lignina em massa seca (Equação 3).

$$L (\%) = \frac{M_{pb} - M_p}{M} * 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde $L(\%)$ corresponde ao percentual de lignina em massa seca, M_{pb} corresponde ao valor da massa de papel de filtro com a biomassa remanescente da hidrólise ácida, M_p corresponde a massa do papel de filtro e M a massa de biomassa inicial.

3.2.5 Determinação do teor de cinzas totais

Para a determinação do teor de cinzas totais (Equação 4), foram pesados 2g de biomassa, em cadinhos de porcelana com tampa, previamente tarados. O conjunto (biomassa e cadinho) foi submetido à temperatura de 800°C, por 2h, em

forno do tipo mufla. Posteriormente, o cadinho com a biomassa foi dessecado e pesado. O procedimento foi realizado em triplicata.

$$Ct (\%) = \frac{Mcb - Mc}{Mb} * 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde $Ct(\%)$ corresponde ao percentual de cinzas totais na palma forrageira, Mcb corresponde a massa do conjunto (cadinho e biomassa) após a mufla, Mc corresponde a massa do cadinho e Mb corresponde ao valor da massa da biomassa usada para a determinação de cinzas totais (2 g).

3.3 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA SECA

Com o objetivo de facilitar o acesso enzimático à matriz celulósica, a biomassa seca e triturada, de IPA-Sertânia, foi submetida ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. Os testes iniciais, para avaliar a eficiência do pré-tratamento, no aumento do percentual de conversão de celulose em glicose, na hidrólise enzimática, foram realizados com 35 mL de solução aquosa de H_2SO_4 , a 1% v/v, em erlenmeyer de 125 mL, contendo 5g da biomassa (12.5 % w/v). A palma ficou em contato com a solução ácida durante 3h, sob agitação de 150 rpm, a 50°C, em mesa incubadora rotativa. Também foi realizado, sob as mesmas condições, o pré-tratamento da biomassa utilizando apenas água.

Posteriormente, a suspensão foi filtrada em papel de filtro qualitativo, cuja fração líquida foi analisada por Cromatografia líquida de alta eficiência. O procedimento foi realizado em triplicata, para cada tipo de pré-tratamento, no modelo de delineamento inteiramente casualizado.

3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

3.4.1 Atividade enzimática da Celluclast®

Para se determinar o volume enzimático necessário, para se aplicar uma determinada carga enzimática à dada biomassa, é necessário conhecer a atividade da enzima escolhida. Para tal, foi realizada a determinação da atividade enzimática da Celluclast® 1.5L (Novozymes), em acordo com Ghose (1987), onde 50mg de papel de filtro quantitativo (Whatman®, referência 1, porosidade 11 µm) foi transferido para tubo de ensaio contendo 0,5 mL da diluição enzimática (1:10; 1:50; 1:100; 1:150; 1:200) e 1 mL de tampão citrato 50 mM (pH 4,8). Nos ensaios correspondentes ao branco da enzima, não havia papel de filtro, de mesmo modo que no branco do substrato não havia volume enzimático. O sistema foi mantido em banho-maria por 1h, a 50°C.

Posteriormente, foi acrescentado ao sistema 3 mL de solução de ácido dinitrosalicílico (DNSA) e o conjunto foi novamente submetido ao banho-maria, por 5 minutos, a 100°C.

Para a quantificação do teor de glicose liberada, pela ação enzimática sobre o papel, foi feita uma curva de calibração com soluções de glicose (1,0 mg/0,5 mL; 1,65 mg/ 0,5 mL; 2,5 mg/0,5 mL; 3,35 mg/0,5mL), utilizando 1,5 mL de solução-padrão e 3 mL de DNSA, sendo os tubos de ensaios, com as soluções, mantidos a 100°C, por 5 minutos, em banho-maria. O branco continha 1,5 mL de água destilada e 3mL do DNSA. Após isso, tanto os tubos contendo o hidrolisado enzimático, quanto os das soluções-padrão, foram resfriados em banho de gelo e 0,4 mL do sistema foi transferido para outro tubo de ensaio, ao qual foram acrescentados 5 mL de água destilada.

Para estas diluições, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 540 nm, para a obtenção das equações fornecidas pela curva de calibração (Figura 4.2) e pelo gráfico da atividade enzimática (Figura 4.3).

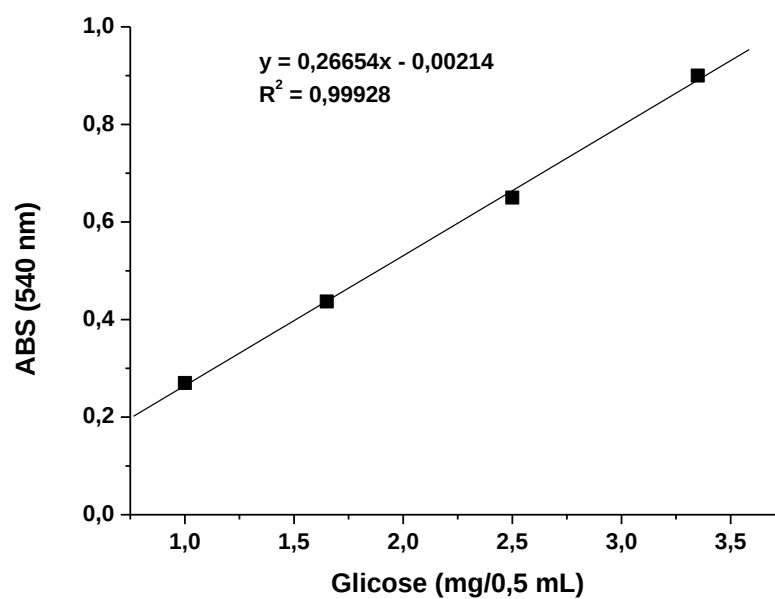


Figura 4. 2. Curva de calibração da glicose para atividade enzimática da Celluclast®

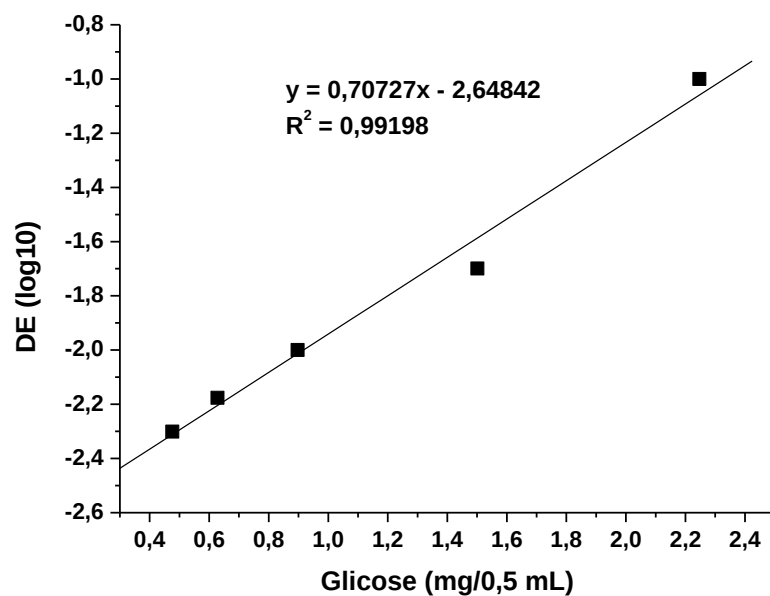


Figura 4. 3. Curva correspondente aos teores de glicose liberados na hidrólise enzimática do papel de filtro pela Celluclast®

3.4.2 Atividade enzimática da Polyfruit®

Para a determinação da atividade de pectinase no complexo enzimático Polyfruit®, foi utilizado o método proposto por Hultin, Sun e Bulger (1966), com adaptações. Foi preparada uma solução de pectina cítrica (1% m/v), utilizando como solvente a solução de NaCl (0,2 M). Um volume de 30 mL, da referida solução, foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL, ao cujo, foi adicionado 1 mL da enzima e o pH foi corrigido ao valor de 4,8, por titulação, com solução de 5 mM de NaCl. O conjunto foi aquecido, posteriormente, em banho-maria, durante 30 minutos, a 50°C. Novamente, pH foi corrigido com a mesma solução anterior. Os volumes utilizados de NaCl 5 mM foram usados para a determinação da atividade enzimática em U/mL, a partir da Equação 6.

$$\text{Atividade enzimática} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{V.M.10^3}{t.Ve} \quad \text{Equação 6}$$

Onde V corresponde ao volume usado para correção de pH, M à molaridade da solução de NaCl (mol/L) usada na titulação, t ao tempo de reação e Ve corresponde ao volume enzimático usado no sistema.

3.4.3 Hidrólise enzimática da biomassa seca de palma forrageira

Para a obtenção de carboidratos passíveis de fermentação, a biomassa sem pré-tratamento, pré-tratada em água e a biomassa pré-tratada em solução ácida, da variedade IPA-Sertânia, foi hidrolisada pelo complexo enzimático Celluclast® 1.5L – Novozymes (6,39 FPU/mL) e pela Polyfruit® (2,37 U/mL). Para verificar a eficiência do pré-tratamento, para uma maior conversão de celulose em glicose, durante a etapa de hidrólise, a fração sólida, dos testes iniciais dos pré-tratamentos, foi submetida à hidrólise enzimática com alta carga de sólidos (25% m/v). Utilizou-se 5g de biomassa pré-tratada, a qual transferida para o erlenmeyer (50 mL), bem como os complexos enzimáticos Celluclast® e Polyfruit®, com cargas de 7,5 FPU/g e 0,47

U/g de biomassa, respectivamente. Para completar o volume reacional de 20 mL, foram adicionados 8 mL de tampão citrato 50mM (pH 4,8), ao sistema. O conjunto foi submetido à agitação de 150 rpm, em mesa incubadora rotativa, a 50°C, por 48h. Também foi realizada, sob as mesmas condições, a hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada e não tratada com e sem surfactante Tween 80 (2,5 g/L). Devido à impossibilidade de formação de fração líquida, pelo alto teor de sólidos, foi necessário acrescentar, ao final da hidrólise, 20 mL de água destilada, para obtenção de um hidrolisado capaz de ser analisado por Cromatografia líquida de alta eficiência. Os procedimentos foram realizados em triplicata.

A partir dos resultados obtidos, pelos testes iniciais acima relatados, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), $2^3 + 3(0)$, para as duas variedades estudadas, utilizando como fatores, a serem avaliados, as cargas de celulase (FPU/g de biomassa), pectinase (U/g de biomassa) e biomassa (% m/v), e como pontos centrais as condições previamente testadas (Tabela 4.1), sem pré-tratamento e sem surfactante. Os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com replicatas apenas no ponto central, durante 48h, a 150 rpm e 50°C.

Posteriormente, foi realizado o estudo cinético das hidrólises enzimáticas das variedades IPA-Sertânia e Orelha de elefante mexicana, nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 48h. Este procedimento foi realizado apenas para as condições determinadas pelo “ensaio 6”, do DCCR, a 150 rpm, 50°C, sem pectinase. A cinética foi realizada em duplicata, também em delineamento inteiramente casualizado.

Tabela 4.1. Delineamento Composto Central Rotacional aplicado à biomassa seca de palma forrageira, para as variedades IPA-Sertânia e Orelha de elefante mexicana.

Ensaio	Celulase (FPU/g de biomassa)	Pectinase (U/g de biomassa)	Biomassa (% m/v)
1	5,00	0,40	20,00
2	5,00	0,40	30,00
3	5,00	0,60	20,00
4	5,00	0,60	30,00
5	10,00	0,40	20,00
6	10,00	0,40	30,00
7	10,00	0,60	20,00
8	10,00	0,50	30,00
9	3,17	0,50	25,00
10	11,83	0,50	25,00
11	7,50	0,33	25,00
12	7,50	0,67	25,00
13	7,50	0,50	16,35
14	7,50	0,50	33,65
15 (PC)	7,50	0,50	25,00
16 (PC)	7,50	0,50	25,00
17 (PC)	7,50	0,50	25,00

PC – Ponto central.

3.4.4 Hidrólise enzimática da biomassa fresca e biomassa seca (10% m/v)

Com a finalidade de avaliar o potencial energético da palma, sem quaisquer processos de secagem ou pré-tratamento químico, foi realizada hidrólise enzimática com a biomassa fresca. Para tal, foram transferidos 20g de biomassa, processada em liquidificador industrial, para erlenmeyer de 250 mL, cujo conjunto foi submetido a agitação de 150 rpm, a 50°C, por 96h, com a finalidade de conhecer o momento de cessação da conversão de celulose, durante a hidrólise enzimática, utilizando 10 FPU/g de Celluclast®. Esses ensaios foram realizados em triplicata.

Após isso, foram realizadas hidrólises enzimáticas da biomassa fresca (10% m/v) e biomassa seca (10% m/v), sob as mesmas condições anteriores, porém por 48h. Para a obtenção do hidrolisado enzimático, não foi usada a enzima PolyFruit® e o tampão citrato (pH 4.8) somente foi utilizado na hidrólise da biomassa seca. A do tipo fresca não necessitou do uso deste componente, pois o seu pH apresenta-se entre 3,5 e 4,5, cujo é o pH de atividade ótima da enzima. Para essas hidrólises, foi avaliado o perfil cinético para os tempos de 0, 6, 12, 24 e 48h. A cinética de formação de glicose foi realizada em duplicata.

Ao final das hidrólises, as suspensões foram filtradas por papel de filtro qualitativo e a fração líquida foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência.

3.5 CINÉTICA DE SECAGEM DA BIOMASSA FRESCA DE PALMA FORRAGEIRA

Devido o DCCR ter determinado que a melhor carga de sólidos, para hidrólise enzimática de palma forrageira, é 30% m/v e, foi possível observar que a biomassa fresca é passível de hidrólise, foi determinado o perfil cinético de secagem, de ambas as variedades de palma forrageira. O ensaio foi realizado para determinar qual o tempo necessário para se atingir a carga de 30% m/v de sólidos, com o objetivo de diminuição de custo nos processo de secagem da biomassa. Para isso, foram transferidos 2Kg de cada tipo de biomassa para um recipiente devidamente e previamente tarado. O conjunto foi mantido em estufa, sendo os ensaios realizados em triplicata e em duas condições de temperatura (65°C – 0, 24, 48, 72, 96 e 120h; 105°C – 0, 6, 10, 24, 36 e 48h). A Equação 7 foi usada para quantificar o teor de carga de sólidos no sistema.

$$\%Carga\ de\ sólidos = \left[\frac{(Mbr - Mr)}{Mi} \right] * 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde *Mbr* corresponde à massa do conjunto (biomassa e recipiente), *Mr*, à massa do recipiente e *Mi* a massa de biomassa inicial.

Após essa etapa, a biomassa fresca a 30% m/v foi hidrolisada pelo complexo enzimático Celluclast® 1.5L Novozymes (10 FPU/g), durante 48h, sem adição de tampão ao sistema.

3.6 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE PALMA FORRAGEIRA

A linhagem JP1, da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, foi inoculada em meio YPD (glicose, 20 g/L; peptona, 20 g/L; extrato de levedura, 10 g/L), em erlenmeyer de 1L, e mantida a 33°C e 150 rpm, por 24h. Como modo de se obter 56g de biomassa microbiana final, a cada 24h eram dobrados os volumes do meio de cultivo. Esse procedimento foi repetido por uma semana. Ao final desta etapa, as células foram centrifugadas (10.000 rpm; 5 minutos), ressuspensas em solução de NaCl (0,08%) e mantidas em geladeira por 24 h. Por conseguinte, as células foram centrifugadas novamente (10.000 rpm; 5 minutos) e 7g de biomassa foram ressuspensos em 63 mL de hidrolisado enzimático de palma forrageira, tanto da biomassa fresca quanto seca (ambas a 30% m/V), quer da variedade IPA-Sertânia, quer da Orelha de elefante mexicana. Para que isso fosse possível, a fração líquida da etapa de hidrólise enzimática da biomassa seca foi diluída previamente, em solução glicosada, de mesma concentração do hidrolisado, para que houvesse a diminuição da densidade do meio.

A etapa fermentativa sucedeu-se de forma estática, em mesa incubadora, durante 8h, a 33°C. Alíquotas de 0,5 mL foram retiradas a cada 1h do processo. As amostras foram devidamente filtradas em membranas e analisadas por Cromatografia líquida de alta eficiência, quanto aos teores de carboidratos e etanol. O procedimento foi realizado em triplicata, para cada tipo de hidrolisado e biomassa vegetal.

As Equações 8, 9 e 10 correspondem ao rendimento (g/g), eficiência (%) e produtividade volumétrica (g/L.h⁻¹) da fermentação alcoólica:

$$Y_{p/s}(g/g) = \frac{E}{G} \quad \text{Equação 8}$$

$$Ef (\%) = \frac{Y_{p/s}}{Y_t} * 100 \quad \text{Equação 9}$$

$$Qp (g/L.h^{-1}) = \frac{E}{t} \quad \text{Equação 10}$$

Onde $Y_{p/s}$ corresponde ao rendimento da produção de etanol, E a concentração de etanol (g/L), G a concentração de glicose (g/L), $Ef (\%)$ a eficiência de fermentação, Y_t ao rendimento teórico estequiométrico da produção de etanol (0,511), Qp a produtividade volumétrica (g/L.h⁻¹) e t ao tempo de fermentação (h).

3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

A quantificação de carboidratos (glicose, xilose, arabinose), ácidos orgânicos (acético, oxálico, galacturônico e fórmico) e etanol foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), detectado por índice de refração, em coluna Aminex[®] (HPX-87H, Bio-Rad, EUA), com vazão 0,6 mL/min, 60°C e, como fase móvel, H₂SO₄ (5 mM).

As análises estruturais da biomassa foram realizadas por difração de raio-X (DRX), no difratômetro Advanced Bruker, modelo D8, com ângulo de varredura de 10° a 50° (ângulo de Bragg 2θ), incremento de 0,02° e tempo de contagem de 1s. O índice de cristalinidade da biomassa foi calculado de acordo com a Equação 11:

$$ICr (\%) = \frac{I_{cristalina} - I_{amorfa}}{I_{cristalina}} * 100 \quad \text{Equação 11}$$

Onde ICr corresponde ao índice de cristalinidade, $I_{cristalina}$ ao valor de intensidade no ângulo 21° e I_{amorfa} ao valor de intensidade no ângulo 18,8°.

Além disso, foram feitas análises de Espectroscopia do infravermelho, por transformada de Fourier (FTIR), em Espectroscópio Bruker, na faixa espectral de 4500 - 600 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

As análises de influência dos fatores investigados, em relação à resposta, assim como a determinação dos valores para a análise de variância (ANOVA), foram realizadas no software Statistic 7.0, para os ensaios do DCCR. Em relação às demais avaliações estatísticas, foi utilizado o método estatístico Teste “t” student pareado, no Origin 6.0.

4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS DADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE PALMA FORRAGEIRA

As biomassas de IPA-Sertânia e Orelha de elefante mexicana foram caracterizadas quanto a sua composição química (Tabela 5.1). Elas apresentaram teores de hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas semelhantes entre si, mas, diferem, mesmo que minimamente, em relação aos teores de celulose. A umidade da biomassa foi de 90,04% e 89,56%, respectivamente. A variedade Orelha de elefante mexicana apresenta teores de carboidratos fibrosos iguais a 39%, valores próximos a variedade “Algerian” (42%), de mesma espécie (KULOYO et al., 2014). Relata-se teores de celulose, para a espécie *Nopolea cochenillifera* corresponde a 31,6%, enquanto que no presente trabalho, esses teores são 25,85% (SOUZA-FILHO et al., 2016). Essa discrepância pode estar relacionada aos tipos de variedades utilizadas, bem como ao solo, área e adensamento em que foram produzidos os vegetais. Os teores de lignina, relatados na Tabela 5.1, correspondem a cerca de metade do valor encontrado, para as espécies de biomassas caracterizadas: *Nopolea cochenillifera*, 10,30%, e *Opuntia ficus-indica*, 15,70% (Souza-Filho et al., 2016). Em contrapartida, para o mesmo parâmetro, a literatura também relata, para a espécie *Opuntia ficus-indica*, valores que variam de 3,6% (MALAININE et al., 2003) a 7,9% (KULOYO et al., 2014), o qual é mais próximo do valor da variedade Orelha de elefante mexicana. Os valores correspondentes aos percentuais de cinzas também foram diferentes, entre 6,0% (SOUZA-FILHO et al., 2016), 16,8% (KULOYO et al., 2014) e 19,6% (MALAININE et al., 2003), para a mesma espécie.

Tabela 5. 1. Caracterização da biomassa seca de palma forrageira para as variedades Orelha de elefante mexicana e IPA-Sertânia.

Compostos	IPA-Sertânia (<i>Nopalea cochenillifera</i>)	Orelha de elefante mexicana (<i>Opuntia ficus-indica</i>)
Celulose (%)	25,85 ± 0,01	28,51 ± 0,06
Hemicelulose (%)	9,08 ± 0,02	10,59 ± 0,02
Lignina (%)	5,77 ± 0,32	6,40 ± 0,28
Extrativos (%)	30,73 ± 1,45	31,03 ± 1,65
Cinzas (%)	11,65 ± 0,47	11,15 ± 0,95
Total (%)	85,76	90,62

4.2 INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO E ÁGUA E DA ADIÇÃO DE TWEEN 80 NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PALMA FORRAGEIRA, COM ALTA CARGA DE SÓLIDOS

O pré-tratamento de biomassa lignocelulósica é tido como uma das etapas mais custosas, na conversão de carboidratos celulósicos, com finalidade fermentativa. Esses valores podem representar de 16-30% do dispêndio na produção de etanol (MOSIER et al., 2005; HUMBIRD et al., 2011).

Surfactantes, como o Tween 80, apresentam a capacidade de elevar os rendimentos na conversão de carboidratos, na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos. Estudos desenvolvidos com biomassas como capim-elefante, papel, palha de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e palhada de milho apresentaram melhor adsorção enzimática, à matriz celulósica, e, por conseguinte, aumento na formação de glicose, podendo estes valores serem incrementados em até 50% (QI; CHEN; WAN et al., 2010; MENEGOL et al., 2014; YU et al., 2015; ZHANG et al., 2017; ALENCAR et al., 2017b). Como modo de avaliar a influência desses dois fatores, na hidrólise enzimática de palma forrageira, a variedade IPA-Sertânia foi escolhida como modelo.

Os teores de carboidratos e ácidos orgânicos, presentes no hidrolisado enzimático, para a biomassa sem pré-tratamento e pré-tratada com água e ácido

sulfúrico (1% v/v), são apresentados na Tabela 5.2. É possível observar que as concentrações de glicose e xilose mostraram-se maiores nos ensaios realizados na ausência de pré-tratamento. Isso contraria o que foi proposto por Ghosh, Ghose e Scheper (2003), cujos afirmaram que, na ausência de pré-tratamento, o rendimento de glicose é inferior a 20%, enquanto que na presença desta etapa, os rendimentos podem superar a taxa de 90%. Isso pode ser explicado pelas características estruturais e composicionais da biomassa.

Tabela 5. 2. Influência do pré-tratamento e do Tween 80, na hidrólise enzimática, realizada conforme as condições dos pontos centrais do DCCR, da variedade IPA-Sertânia.

Tratamentos	Compostos	Sem Tween 80		Com Tween 80	
		C (g/L)	%C	C (g/L)	%C
Sem PT	Ácido Galacturônico	1,65 ± 0,03	1,67	1,85 ± 0,38	2,40
	Glicose	68,83 ± 2,90	75,20	70,58 ± 0,74	77,63
	Xilose	22,00 ± 0,70	5,63	23,27 ± 0,71	10,59
	Ácido Fórmico	2,74 ± 0,32	0,37	5,32 ± 0,71	1,51
	Compostos	Sem Tween 80		Com Tween 80	
		C (g/L)	%C	C (g/L)	%C
H ₂ O	Ácido Galacturônico	1,44 ± 0,56	4,66	2,28 ± 0,21	7,75
	Glicose	53,45 ± 1,50	64,46	60,12 ± 2,35	73,76
	Xilose	21,33 ± 0,01	31,81	23,61 ± 0,07	40,77
	Ácido Fórmico	6,03 ± 0,10	1,82	10,65 ± 1,24	3,85
	Compostos	Sem Tween 80		Com Tween 80	
		C (g/L)	%C	C (g/L)	%C
H ₂ SO ₄ *	Ácido Galacturônico	1,39 ± 0,23	5,11	1,40 ± 0,08	5,14
	Glicose	45,89 ± 1,21	56,34	48,69 ± 1,42	60,24
	Xilose	21,26 ± 1,42	41,88	21,94 ± 0,90	44,56

PT – Pré-tratamento; *Solução de ácido sulfúrico a 1% v/v; C (g/L) – Concentração do composto, em gramas por litro; %C – Percentual de conversão.

As variedades de palma forrageira avaliadas apresentaram baixos teores de lignina (Tabela 5.1) e de cristalinidade da celulose, os quais são $5,24 \pm 0,20\%$ para IPA-Sertânia, e $7,14 \pm 1,32\%$, para a Orelha de elefante mexicana. Esses fatores contribuem para utilização de pré-tratamentos cada vez menos severos ou, até mesmo, a ausência destes, já que este tipo de processo tem por finalidade remover a lignina e causar a desorganização, principalmente, da estrutura da celulose cristalina. Com uma realidade contrária a essa definição, pode-se afirmar que, para a palma forrageira, nas condições testadas, o pré-tratamento químico não melhora a obtenção de carboidratos. De fato, o cenário é oposto. Yang et al. (2015) afirmaram que pelo fato da celulose de palma forrageira ser mais 80% amorfa e para-cristalina, essa porção poderia ser mais facilmente convertida a carboidratos fermentescíveis do que biomassas herbáceas ou lenhosas tradicionais. Quando comparado a esses tipos de biomassa, a palma forrageira apresenta valores inferiores de cristalinidade. *Sorghum bicolor* apresenta teores de cristalinidade entre 32-45%, dependendo da variedade, enquanto que, para cana-de-açúcar, esse valor corresponde a 50%, na biomassa sem pré-tratamento (VANDENBRINK et al., 2012; CALIARI et al., 2017). O índice de cristalinidade da cana-de-açúcar apresenta-se quase que 10 vezes maior que a palma forrageira, apontando, portanto, a sua necessidade de pré-tratamento, em detrimento da cactácea.

As mudanças da biomassa da variedade IPA-Sertânia, o nível de cristalinidade da celulose, também foi avaliada. Para o pré-tratamento com protóxido de hidrogênio e ácido sulfúrico diluído, a cultivar obteve valores iguais a 10,42% e 14,83%, nessa ordem. Esses valores correspondem a quase o dobro e ao triplo do teor obtido para a biomassa sem pré-tratamento. O aumento da cristalinidade da celulose, em biomassas pré-tratadas, tem sido reportado na literatura (CHANDEL et al., 2014; ALENCAR et al, 2017a).

Realizaram-se análises por Espectroscopia do infravermelho, por transformada de Fourier, com o objetivo de verificar as mudanças ocorridas na biomassa, através da etapa de pré-tratamento (Figura 5.1). As principais diferenças de absorbâncias estão na região de 3000 e 3600 cm^{-1} . Esse valor, na região de 3400 cm^{-1} , refere-se à OH^- da celulose, indicando que o pré-tratamento promoveu parcial

perda desta porção da biomassa, já que a intensidade deste sinal está reduzida em mais de 50% neste número de onda (GHALI et al., 2012). Os picos na região de 1200 cm^{-1} estão relacionados à ligação C-O-C deste homopolímero, cujas absorbâncias também são menores para as amostras pré-tratadas (MOTHÉ; DE MIRANDA, 2009). Isso ratifica o que será apresentado pela Tabela 5.3, a qual apresenta elevados teores de glicose na fração líquida do pré-tratamento, além de alicerçar o que foi proposto por Yang et al. (2015), que mais 80% da celulose é amorfa ou para-cristalina, ou seja, mais facilmente removível. O grupo carbonil (C=O), na região de 1700 cm^{-1} , está relacionado à hemicelulose (MOTHÉ; DE MIRANDA, 2009). O valor de absorbância neste número de onda, para a biomassa não tratada, é de 0.06, enquanto que para todas as condições de pré-tratamento, é 0.02, aproximadamente. Isso indica remoção parcial desta porção da biomassa, durante esta etapa. Além desta região, a hemicelulose também é identificada através das ligações C-O-C, que estão representadas em números de onda próximos a 1100 cm^{-1} (MOTHÉ; DE MIRANDA, 2009). Neste setor, as amostras não tratadas também apresentam maiores picos, em detrimento das tratadas. Esta situação será ratificada na Tabela 5.3, com a elevada presença de xilose no filtrado do pré-tratamento. A região de 1400 cm^{-1} está relacionada à lignina (XU et al., 2013), particularmente a ligação C-O do anel siringil, presente em sua composição (KIM et al., 2003). Nela, é possível observar que as absorbâncias, das biomassas que sofreram pré-tratamento, também estão reduzidas pela metade, em relação às não tratadas. A Figura 5.1 também corrobora o que foi apresentado pela Tabela 5.1, que a biomassa de palma forrageira é majoritariamente composta por celulose.

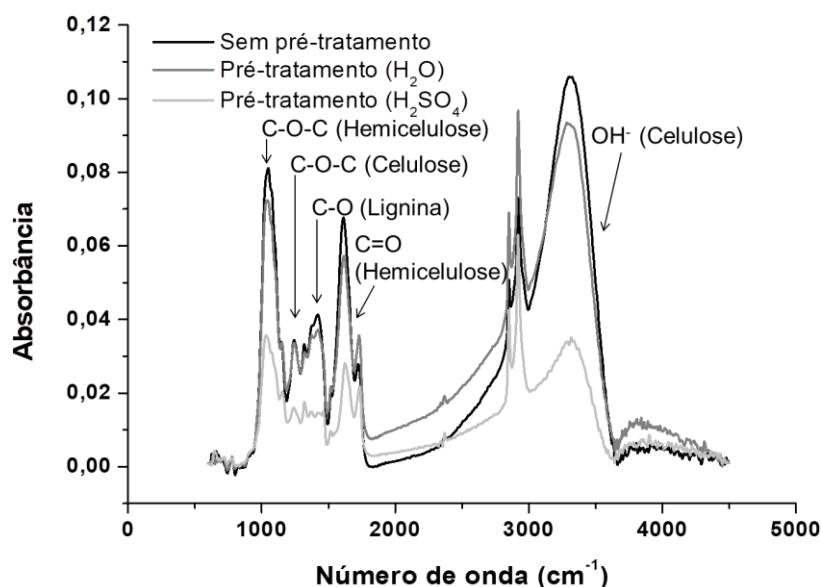


Figura 5. 1. Espectroscopia do infravermelho, por transformada de Fourier, para as biomassas sem-pré-tratamento e pré-tratadas por água e ácido sulfúrico (1% v/v), das variedades IPA-Sertânia de palma forrageira

Outro fator que contribui para não utilização de pré-tratamento dessa biomassa é o teor de carboidratos liberados, para a fração líquida, já nessa etapa (Tabela 5.3), cujo é corroborado por Kuloyo et al. (2014). Eles obtiveram 7,4 g/L de glicose, ao pré-tratarem a biomassa seca da cultivar “Algerian” (*O. ficus-indica*), com ácido sulfúrico diluído (1,5% m/m). Isso vai de encontro a uma das finalidades do pré-tratamento, que é a desorganização da estrutura lignocelulósica, sem, ou liberando o mínimo possível, de carboidratos durante esse processo (CHANDRA et al., 2007). Uma das alternativas possíveis, para contornar tal situação, seria a fermentação dessa fração líquida, o que poderia gerar até 7,90 g/L e 9,66 g/L de etanol, rendendo 0,79% v/v e 0,97% v/v, para o tratamento com água e com ácido, respectivamente. Porém, essa etapa, com *Saccharomyces cerevisiae* (principal levedura usada no processo sucro-alcooleiro), exige um pH próximo a 4,8, diferentemente do encontrado no meio com e sem ácido, cujos são, aproximadamente, 1 e 7, nessa ordem. Portanto, há a necessidade de correção do mesmo. O ajuste do pH, do meio ácido, causaria a formação de sal, gerando estresse salino à levedura e, portanto, diminuiria a sua capacidade fermentativa,

com finalidade etanólica. Isso é corroborado pelo estudo desenvolvido por Tilloy, Ortiz-Julien e Dequin (2014). Nele, é afirmado que o meio hiperosmótico deslocou o metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de glicerol, succinato e 2,3-butanodiol ao invés de produzir etanol. Além disso, a adição de quaisquer outros componentes, sejam ácidos (no caso do pré-tratamento com água) e/ou bases, implica no aumento do custo do processo, o que não se apresenta vantajoso. Ou seja, ao final da etapa de produção de etanol, além do custo no pré-tratamento, estar-se-ia aumentando o valor total do processo, ao ter que promover a correção desse pH. Porém, ao se optar pelo não uso do pré-tratamento, obtém-se o carboidrato de forma direta, mais rápida e eficiente, principalmente em relação ao potencial energético.

Tabela 5. 3. Caracterização da fração líquida do pré-tratamento, com água e H₂SO₄ 1% v/v, de palma forrageira, variedade IPA-Sertânia.

Compostos	H₂O C (g/L)	H₂SO₄ C (g/L)
Ácido		
Galacturônico	2,06 ± 0,13	2,38 ± 0,04
Glicose	15,47 ± 0,31	18,90 ± 0,57
Xilose	14,86 ± 0,92	20,08 ± 0,55

C (g/L) – Concentração do composto, em gramas por litro.

Ou seja, pré-tratamentos químicos, além de representarem maior custo na produção de biocombustível, em palma forrageira, significam a perda de potencial fermentativo por parte da biomassa. Essa sentença é corroborada por Mosier et al. (2005), cujo afirma que “pré-tratamentos devem ser ponderados em função do seu impacto no custo das fases de transformação, a jusante e da compensação entre custos operacionais, de capital e biomassa”.

Em relação ao Tween 80 (Tabela 5.2), o aumento dos valores desses carboidratos variou de 2,48%, para a glicose sem tratamento, a 11,09% para a mesma hexose, no pré-tratamento com água. O uso deste surfactante não iônico

não provocou o aumento significativo na formação de glicose, principal monossacarídeo do processo fermentativo, de forma que a relação custo-benefício fosse positiva. Isso é corroborado pelo Teste “t” pareado, cujo afirmou que não há diferença significativa entre os ensaios com e sem o tensoativo (sem pré-tratamento: $t = -0,52$, $p = 0,65$; pré-tratamento com água: $t = -2,48$, $p = 0,24$; pré-tratamento com ácido sulfúrico (1% v/v): $t = -2,09$, $p = 0,28$). Estudos relatam que o uso de surfactantes aumentam os rendimentos da hidrólise enzimática da celulose devido à diminuição da ligação improdutiva da enzima à lignina, tornando as enzimas mais livres, para reagirem com a matriz celulósica, além de não afetarem a atividade enzimática (ERIKSSON et al., 2002; QI et al., 2011; LI et al., 2012). Além disso, Cao e Aita (2013) observaram que o surfactante potencializa a digestibilidade e altera a cristalinidade da porção celulósica do material, visto que permite que a enzima se torne mais hidrofílica, facilitando sua interação com o homopolímero. Porém, como apresentado anteriormente, palma forrageira apresenta baixos valores de lignina e cristalinidade da celulose, justificando o porque da presença do Tween 80 não ter aumentado, significativamente, a conversão de celulose nesse tipo de biomassa. Nesse contexto, a utilização dos pré-tratamentos e do surfactante citados, para uma maior obtenção de monossacarídeos fermentescíveis, não se apresenta viável.

4.3 OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA, COM ALTA CARGA DE SÓLIDOS, DE VARIEDADES DE PALMA FORRAGEIRA

A resposta escolhida, para a avaliação da otimização do sistema, a partir das condições propostas no planejamento fatorial (Tabela 4.1), foi o percentual de conversão de celulose em glicose. Os ensaios que apresentaram esses teores, acima de 70%, foram 1, 5, 7, 13, 15, 16 e 17, para a IPA-Sertânia (Tabela 5.4). Porém, ao analisar a concentração de glicose obtida, fator crucial para o processo fermentativo, em cada uma dessas condições, observa-se que esses valores variam de 46,94 g/L, para o ensaio 13 (que contem o maior teor de conversão – 79,20%), e 68,23 g/L, para o 15 (74,36%). A razão pela qual há a discrepância de o ensaio com maior teor de conversão deter a menor concentração de glicose se deve ao teor de biomassa empregado no sistema. Isso é explicado através da equação conversão

de celulose (%) = $\{ \text{Glicose (g/L)} / [\text{biomassa (g/L)} * (\% \text{celulose} / 100) * 1,11] \} * 100$. A partir dela é possível observar que quanto maior a concentração de biomassa no sistema, menor a conversão de celulose. Portanto, mesmo o ensaio 13 possuindo o maior teor de conversão, pelo fato deste deter a menor carga de biomassa empregada, ele apresenta a menor concentração de glicose obtida. Isso seria um dos fatores que acarretaria numa menor formação de etanol. Nesse contexto, ao analisar a relação “concentração de glicose/conversão de celulose”, apresentam-se, como melhores opções, os ensaios 6 (69,39 g/L), 8 (66,90 g/L) e 15 (68,23 g/L). Os valores de glicose, dentre as referidas condições, não são tão diferentes entre si, já que possuem um coeficiente de variação de 1,83 %. Porém, ao se realizar uma projeção, considerando 100% de conversão, os teores de glicose final, para cada um deles, seria 115,28 g/L, para os dois primeiros, e 91,76 g/L para o último. Portanto, a escolha da melhor condição, dentre as propostas, ocorreria entre os ensaios 6 e 8, que diferem apenas na carga de pectinase empregada. Considerando-se que o ensaio 6 apresenta menor carga de pectinase, este é definido como a melhor condição para a realização da hidrólise enzimática, com alta cargas de sólidos, da variedade IPA-Sertânia. De forma semelhante, ocorre para a variedade Orelha de elefante mexicana, onde o ensaio 6 também foi escolhido como aquele que possui as melhores condições para a hidrólise enzimática (Tabela 5.4).

Avaliou-se a liberação de glicose e conversão de celulose, a partir da hidrólise enzimática de biomassa (10% m/v; 20 FPU/g; 50 °C; 150 rpm), com pré-tratamento ácido-alcálico, de duas espécies de palma forrageira: *Opuntia ficus indica* e *Nopalea cochenillifera* (SOUZA-FILHO et al., 2016). Para as condições propostas, os autores obtiveram 54,42 g/L (82,8%) e 62,14 g/L (58,20%) de glicose, respectivamente. Quando comparado às condições de hidrólise em alta carga de sólidos, os valores obtidos para os hidrolisados de palma forrageira, foram inferiores aos relatados por Chiarello et al. (2016), que realizaram a etapa de hidrólise enzimática (72h), com alta carga de sólidos (20% m/v), para bagaço de cana-de-açúcar e *Eucalyptus urograndis*, pré-tratado com explosão a vapor, obtendo-se 103 g/L e 125 g/L de glicose, respectivamente. A menor concentração de glicose, nos hidrolisados de palma forrageira, é decorrente dos menores teores de celulose neste tipo de biomassa, em relação às biomassas tradicionais.

Tabela 5. 4. Influência das cargas de celulase, pectinase e biomassa, no planejamento composto central rotacional (DCCR), na formação de glicose e conversão de celulose, durante a hidrólise enzimática de palma forrageira, variedades IPA-Sertânia e Orelha de elefante mexicana.

Ensaio	Celulase (FPU/g de biomassa)	Pectinase (U/g de biomassa)	Biomassa (% m/v)	IPA-Sertânia		Orelha de elefante mexicana	
				Glicose (g/L)	Cc (%)	Glicose (g/L)	Cc (%)
1	5,00	0,40	20,00	54,55	75,21	51,11	60,99
2	5,00	0,40	30,00	59,27	48,43	65,26	49,16
3	5,00	0,59	20,00	49,16	65,83	46,04	52,97
4	5,00	0,59	30,00	61,69	51,25	59,82	43,44
5	10,00	0,40	20,00	53,87	74,03	55,29	67,59
6	10,00	0,40	30,00	69,39	60,19	76,15	60,63
7	10,00	0,59	20,00	54,34	74,85	56,24	69,10
8	10,00	0,59	30,00	66,90	57,30	66,70	50,68
9	3,17	0,47	25,00	50,39	49,48	51,08	45,18
10	11,83	0,47	25,00	62,06	65,75	71,37	70,83
11	7,50	0,35	25,00	59,13	61,67	65,38	63,27
12	7,50	0,71	25,00	63,01	67,08	63,50	60,88
13	7,50	0,47	16,60	46,94	79,20	41,50	56,67
14	7,50	0,47	33,40	61,50	45,86	62,13	38,39
15 (PC)	7,50	0,47	25,00	68,23	74,36	61,93	58,90
16 (PC)	7,50	0,47	25,00	67,76	73,70	64,78	62,50
17 (PC)	7,50	0,47	25,00	65,34	70,33	63,18	60,47

PC – Ponto central; %Cc – Conversão de celulose.

O hidrolisado enzimático também foi caracterizado em relação aos teores dos ácidos galacturônico e fórmico, assim como ao monossacarídeo xilose, para as variedades IPA-Sertânia (Tabela 5.5) e Orelha de elefante mexicana (Tabela 5.6). Considerando-se que o ensaio escolhido como aquele que possui as melhores condições para a realização da hidrólise enzimática é o 6, este apresenta

concentrações significativas de xilose, em ambas as cultivares. Para a Sertânia, a concentração de glicose é de 22,61 g/L, enquanto que, na Tabela 5.6, este valor é de 24,44 g/L. Conforme a estequiometria da reação da produção de etanol, a partir da xilose, ($3 \text{ C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5 \rightarrow 3 \text{ C}_2\text{H}_6\text{O} + 5 \text{ CO}_2$), o rendimento teórico é, assim como para a glicose, de 0,511. Nesse contexto, a partir da pentose, seria possível produzir até 11,53 g/L (Sertânia) e 12,46 g/L (Orelha de elefante) de etanol.

Tabela 5. 5. Caracterização do hidrolisado enzimático obtido conforme as condições propostas no planejamento composto central rotacional (DCCR), para a variedade IPA-Sertânia.

Ensaio	Ácido Galacturônico		Xilose		Ácido Fórmico	
	C (g/L)	%Conversão	C (g/L)	%Conversão	C (g/L)	%Conversão
1	3,11	5,70	17,53	6,07	2,31	3,62
2	6,52	11,40	21,61	3,45	4,73	4,93
3	2,43	2,59	12,82	0,00	1,53	2,39
4	3,02	0,70	22,08	4,98	2,08	2,17
5	2,54	3,11	15,73	0,00	2,16	3,38
6	2,76	0,00	22,61	6,74	1,98	2,07
7	2,87	4,61	16,92	3,04	2,27	3,55
8	2,54	0,00	20,98	1,36	1,89	1,97
9	3,92	5,45	23,24	10,59	2,45	3,07
10	3,05	2,26	21,82	4,96	2,77	3,46
11	3,14	2,58	20,13	0,00	2,08	2,60
12	3,01	2,09	19,96	0,00	2,33	2,91
13	2,48	13,71	14,24	5,87	1,98	3,72
14	2,61	7,18	22,87	0,00	2,17	2,03
15 (PC)	3,25	2,99	21,44	3,44	2,23	2,79
16 (PC)	2,91	1,72	21,10	2,11	2,45	3,07
17 (PC)	2,92	1,78	20,55	0,00	2,30	2,88

PC – Ponto central.

Tabela 5. 6. Caracterização do hidrolisado enzimático obtido conforme as condições propostas no Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR), para a variedade Orelha de elefante mexicana.

Ensaio	Ácido Galacturônico		Xilose		Ácido Fórmico	
	C (g/L)	%Conversão	C (g/L)	%Conversão	C (g/L)	%Conversão
1	2,70	5,14	17,98	8,48	2,24	3,01
2	2,70	1,90	24,08	2,73	2,12	1,89
3	3,16	6,96	21,17	1,92	2,74	3,67
4	2,65	1,77	24,53	3,99	2,26	2,02
5	2,28	3,48	17,35	5,83	2,23	2,99
6	2,42	1,17	24,44	3,73	2,53	2,26
7	2,24	3,34	17,46	6,31	2,13	2,85
8	2,38	1,05	24,50	3,91	2,52	2,26
9	2,55	2,63	19,37	1,28	2,00	2,15
10	1,88	0,52	19,45	1,57	2,27	2,44
11	2,65	2,97	20,72	5,87	2,30	2,46
12	2,51	2,51	20,35	4,63	2,17	2,33
13	2,34	5,01	14,07	0,00	2,21	3,56
14	2,00	0,00	20,90	0,00	1,91	1,53
15 (PC)	2,38	2,12	18,98	0,00	2,03	2,17
16 (PC)	2,68	3,04	20,63	5,59	2,16	2,31
17 (PC)	3,14	4,50	28,51	2,40	2,78	2,98

PC – Ponto central.

Saccharomyces cerevisiae é a levedura mais amplamente utilizada na conversão de glicose em etanol, porém a mesma não metaboliza xilose. Olsson e Hahn-Hägerdal (1996) mencionaram que leveduras do gênero *Candida* (espécies *blankii*, *famata*, *fructus*, *guilliermondii* e *sp*); *Kluyveromyces cellobiovorus* e *marxianus*; *Pichia segobiensis* e *stipitis* e *Schizosaccharomyces pombe* detêm a capacidade de catalisar a conversão anaeróbica de xilose em etanol. Mais recentemente, a levedura *Spathaspora passalidarum* também apresentou a capacidade de co-fermentar carboidratos além da glicose, como xilose e celobiose (NGUYEN et al., 2006; LONG et al., 2012). A partir desta habilidade, essas leveduras conseguem potencializar a produção de etanol, a partir de hidrolisados de biomassa lignocelulósica.

O gráfico de pareto apresenta qual (is), dos fatores analisados, foi (ram) significativo (s) para o sistema, a partir de um valor de “p” pré-definido, neste caso 0,05. Nessa condição, para ambas as variedades (Figura 5.2.A e B), apenas os fatores celulase e biomassa mostraram-se significativos. Isso informa que, sob as condições impostas, deve-se optar por uma menor carga de pectinase, como modo de diminuição do custo enzimático aplicado ao sistema.

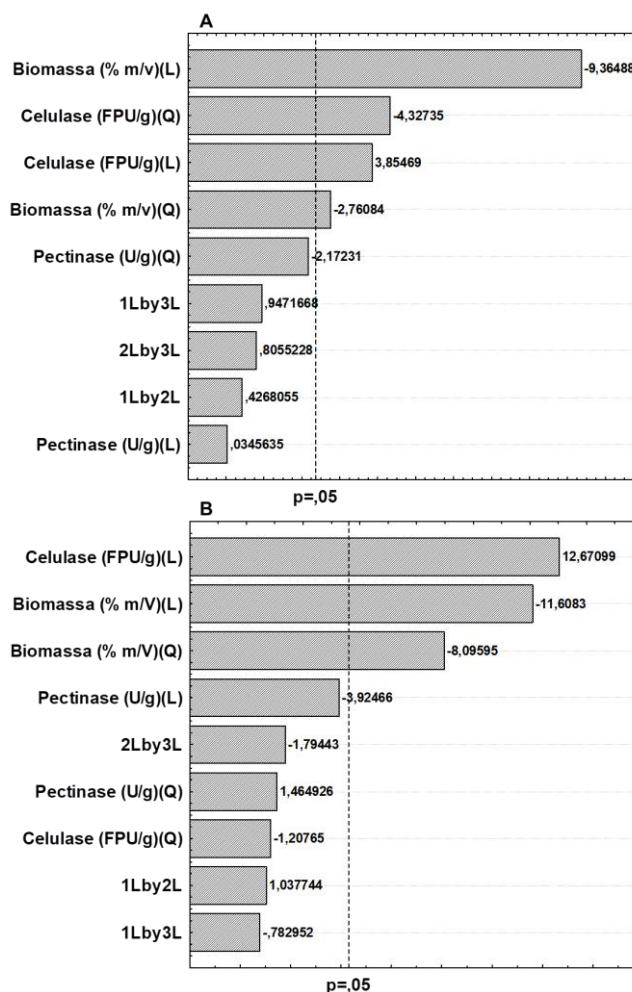


Figura 5. 2. Gráfico de Pareto para a significância dos fatores Celulase (FPU/g), Pectinase (U/g) e Biomassa (% m/v), no Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR), para as variedades IPA-Sertânia (A) e Orelha de elefante mexicana (B). Gráfico de Pareto para a significância dos fatores Celulase (FPU/g), Pectinase (U/g) e Biomassa (% m/v), no Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR), para as variedades IPA-Sertânia (A) e Orelha de elefante mexicana (B). L – Coeficiente linear do fator; Q – coeficiente quadrático do fator; 1Lby2L – Interação entre os coeficientes lineares da celulase e da pectinase; 1Lby3L – Interação entre os coeficientes lineares da celulase e da biomassa; 2Lby3L – Interação entre os coeficientes lineares da pectinase e da biomassa; p – nível de significância da ANOVA (Análise de variância).

A partir dos fatores e suas interações, é gerada uma equação geral do modelo proposto, para cada uma das variedades: IPA-Sertânia (Equação 7) ou Orelha de elefante mexicana (Equação 8). A equação indica de que forma, seja positivamente ou negativamente, os fatores interferem, de modo a orientar qual o sentido que deve ser tomado para a otimização do sistema.

$$\%Cc = 72,63 + 3,88C - 4,80C^2 + 0,03P - 2,41P^2 - 9,43B - 3,06B^2 + 0,56CP + 1,25CB + 1,06PB$$

Equação 7

$$\%Cc = 60,54 + 6,19C - 0,65C^2 - 1,92P + 0,79P^2 - 5,67B - 3,36B^2 + 0,66CP - 0,50CB - 1,15PB$$

Equação 8

Onde %Cc corresponde à resposta conversão de celulose, C ao fator celulase, P ao Pectinase e B ao biomassa.

Com a informação obtida pelos gráficos de pareto (Figura 5.2.), em relação à significância dos fatores, é apresentada a equação final, para as cultivares Sertânia (Equação 9) e Orelha de elefante mexicana (Equação 10). Nessas equações, são considerados apenas os fatores que de fato interferem no sistema. Portanto, pode-se afirmar, a partir dos sinais “+” (positivo) e “-” (negativo), que em ambas as equações, para o modelo linear, o aumento de carga de celulase e a diminuição da biomassa, aumentam a conversão de celulose. Isso é esperado, visto que uma maior fluidez do sistema facilita a interação da enzima com a matriz celulósica.

$$\%Cc = 72,63 + 3,88C - 4,80C^2 - 9,43B - 3,06B^2$$

Equação 9

$$\%Cc = 60,54 + 6,19C - 5,67B - 3,36B^2$$

Equação 10

Onde %Cc corresponde à resposta conversão de celulose, C ao fator celulase e B ao biomassa.

A partir da relação entre os fatores significativos (Celulase e Biomassa) e a resposta (Conversão de celulose), foi formada a superfície de resposta, para as variedades IPA-Sertânia (Figura 5.3.A) e Orelha de elefante mexicana (Figura 5.3.B). As figuras ratificam que a diminuição da carga de biomassa e o aumento da carga de celulase contribuem para o aumento da conversão de celulose. Essa conclusão está em acordo com o que foi proposto pelas equações dos modelos, anteriormente.

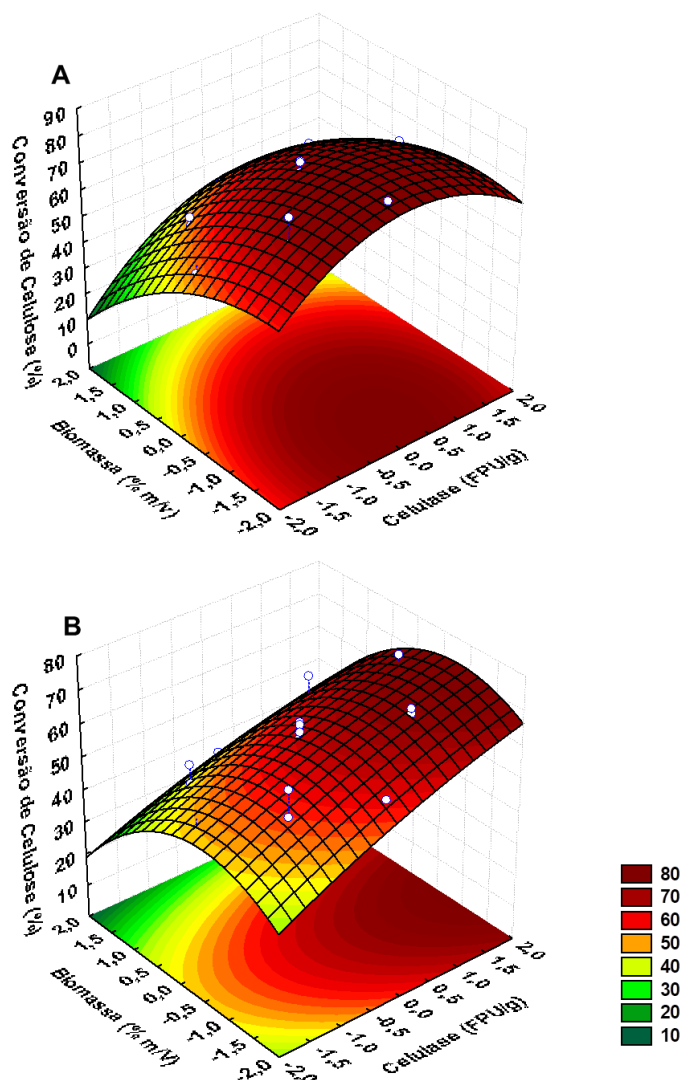


Figura 5. 3. Superfícies de resposta, gerada a partir da interação dos fatores significativos para o Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR) proposto, das variedades IPA-Sertânia (A) e Orelha de elefante mexicana (B)

Cada modelo apresentado possui um coeficiente de determinação (R^2), que indica o quão ajustado ele está. Para as variedades, o valor do $R^2 = 0,95$. Isso significa que apenas 5% da variância total não pode ser explicada pelo modelo. Gao et al. (2009) afirmaram que um modelo de regressão, com valor R^2 superior a 0,9, pode ser considerado como tendo uma alta correlação. A correlação corresponde à associação linear entre duas variáveis. Como forma de avaliar se o modelo apresenta um alto grau de correlação entre os valores observados e previstos, é definido o coeficiente de determinação ajustado (R^2 adj), que para ambas foi de 0,9.

Para ratificar o ajuste do modelo, é realizado o teste F, com o objetivo de avaliar a relevância estatística do experimento, a partir dos valores apresentados na Tabela 5.8. Para tal, é determinado o valor de F através da razão entre a média quadrática de regressão e a média quadrática residual (MQ_R/MQ_r), além da razão entre a média quadrática da falta de ajuste e do erro puro (MQ_{faj}/MQ_{ep}). Neto, Scarminio e Bruns (2010) afirmam que para que os resíduos não interfiram significativamente no modelo, o quociente da operação MQ_R/MQ_r deve ser maior que o valor de F tabelado, enquanto que para MQ_{faj}/MQ_{ep} , este valor deve ser menor. E isso é observado em ambos os modelos. Para a variedade IPA-Sertânia, o valor de F observado, para a razão MQ_R/MQ_r , foi 13,98, enquanto que para a orelha de elefante, este valor é de 21,75. Em relação ao quociente obtido em MQ_{faj}/MQ_{ep} , os valores são 3,74 e 3,85, respectivamente. A partir dos graus de liberdade, foi determinado o valor de F tabelado, que é 3,68 e 19,30, para as divisões MQ_R/MQ_r e MQ_{faj}/MQ_{ep} , com $p = 0,05$, nesta ordem. Portanto, ao final da análise estatística apresentada, é possível afirmar que os modelos propostos, para ambas as cultivares, apresentam-se bem ajustados. Além disso, a falta de ajuste, para a IPA-Sertânia ($p = 0,45$) e Orelha de elefante ($p = 0,22$), não foi significativa.

Tabela 5. 7. Análise de variância, para os planejamentos compostos centrais rotacionais (DCCR) realizados para as variedades IPA-Sertânia e Orelha de elefante mexicana.

Cultivares	Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática
IPA-Sertânia	Regressão	1742,33	9	193,59
	Resíduo	96,97	7	13,85
	Falta de ajuste	87,61	5	17,52
	Erro puro	9,36	2	4,68
	Total	1839,30	16	
Orelha de elefante Mexicana	Regressão	1296,96	9	216,16
	Resíduo	69,55	7	9,94
	Falta de ajuste	63,02	5	12,60
	Erro puro	6,53	2	3,27
	Total	1366,51	16	

4.4 INFLUÊNCIA DA PECTINASE NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA, COM ALTA CARGA DE SÓLIDOS

Após ser verificado que o fator pectinase, para as cargas analisadas, não foi significativo no sistema, foram realizados ensaios, nas mesmas condições do ponto escolhido nos planejamentos (ensaio 6), na presença e ausência desta enzima (Tabela 5.9). Para a variedade IPA-Sertânia, a variação de glicose entre os ensaios realizados, com e sem pectinase, é de 3,44%, enquanto que para a Orelha de elefante o intervalo é de 4,60%. Foi realizado Teste “t” pareado, entre as referidas condições, a qual apontou que, para ambas as cultivares, não há diferença significativa entre as amostras com e sem pectinase (Sertânia – $t = -1,24$, $p = 0,43$; Orelha de elefante – $t = 1,31$, $p = 0,26$). A pectinase, além de promover a hidrólise

da pectina, tem, por função, a diminuição da tensão superficial do meio e, por conseguinte, sua viscosidade (ZHANG et al., 2013). Essa foi a razão pela qual a enzima foi usada nos ensaios com alta carga de sólidos e que a faz ser utilizada na indústria de alimentos. Porém, através dos dados apresentados, pode-se observar que ela não teve efeito significativamente positivo no meio, de modo que isso facilitasse a ação das celulases, na formação de glicose. Portanto, o seu uso torna-se dispensável. De forma semelhante foi o comportamento para a xilose e para o ácido galacturônico. O ácido fórmico foi identificado apenas no hidrolisado para os ensaios realizados com pectinase.

Estudos tem relatado o uso de pectinase na hidrólise enzimática de palma forrageira. Santos et al. (2016) hidrolisaram a biomassa fresca, da variedade de gigante (*Opuntia ficus-indica*), apenas com pectinase, pré-tratada termicamente em autoclave, obtendo 11,26 g/L de glicose. Já Kuloyo et al. (2014) quantificaram 45,5 g/L da hexose, em biomassa de palma forrageira, previamente seca ao sol e pré-tratada com ácido sulfúrico (1,5% m/m), ao realizarem a hidrólise com Pectinex Ultra SP-L, Celluclast 1.5L e Novozyme 188 (β -glucosidase).

Tabela 5. 8. Influência da pectinase na hidrólise enzimática, realizada em acordo com o ensaio 6, do planejamento experimental, para as variedades IPA-Sertânia e Orelha de elefante mexicana.

Variedades	Compostos	Sem pectinase		Com pectinase	
		C (g/L)	%C	C (g/L)	%C
IPA-Sertânia	Glicose	67,72 $\pm$ 0,46	58,25	70,05 $\pm$ 2,75	60,96
	Xilose	22,00 $\pm$ 1,55	4,72	22,60 $\pm$ 0,70	6,71
	Á. Galacturônico	2,49 $\pm$ 0,12	0,00	2,57 $\pm$ 0,06	0,00
	Ácido fórmico	0,00 $\pm$ 0,00	0,00	1,91 $\pm$ 0,13	1,68
Orelha de	Glicose	72,41 $\pm$ 2,98	56,69	75,74 $\pm$ 3,38	60,21
	Xilose	22,29 $\pm$ 0,76	1,29	23,89 $\pm$ 3,38	2,09

elefante					
mexicana	Á. Galacturônico	2,38 ± 0,04	0,94	2,49 ± 0,10	1,34
	Ácido Fórmico	0,00 ± 0,00	0,00	2,42 ± 0,05	1,98

C (g/L) – Concentração do composto, em gramas por litro; %C – Percentual de conversão; ND – Não determinado.

Após a determinação das melhores condições para a hidrólise enzimática, com alta carga de sólidos, e a confirmação da não necessidade do uso de pectinase, para uma maior formação de carboidratos fermentescíveis, foi realizada a cinética de formação dos ácidos orgânicos e monossacarídeos, para a IPA-Sertânia, sem pectinase (Figura 5.4). É possível observar que, já no início da hidrólise, glicose e xilose já estão presentes. Isso ocorre devido ao processo de secagem da biomassa, cuja possui parte de seus carboidratos na forma monossacarídica, os quais permanecem aderidos à biomassa, após esse processo.

A Figura 5.4 apresenta, para IPA-Sertânia, que em 6h de hidrólise, a concentração de glicose atinge o valor de 47 g/L, que é elevada a 62 g/L, 18h depois. Entre o intervalo de 24h e 48h, não houve diferença significativa ($t = -3,00$; $p = 0,21$), para o Teste “t” pareado, a 5%. Já a Orelha de elefante mexicana apresentou uma concentração inicial de glicose igual a 18,59 g/L (Figura 5.4), obtendo, ao final do processo, 74 g/L. Em 6h, a hexose já está em 50 g/L. Entre 24h e 48h, os valores são significativamente diferentes ($t = -59,21$; $p = 0,01$), porém, às 48h, a conversão de celulose é de 56,69%. Os valores de ácido galacturônico e xilose não variaram no intervalo de 48h.

Baixa carga de pectinase, ou a sua ausência, implica na diminuição da formação de ácido galacturônico, cujo é o maior constituinte da estrutura da pectina. Isso justifica a não variação da concentração desse ácido. Em relação à xilose, o teor de xilanase no complexo enzimático Celluclast® é traço, o que justifica a baixa alteração nos valores da pentose.

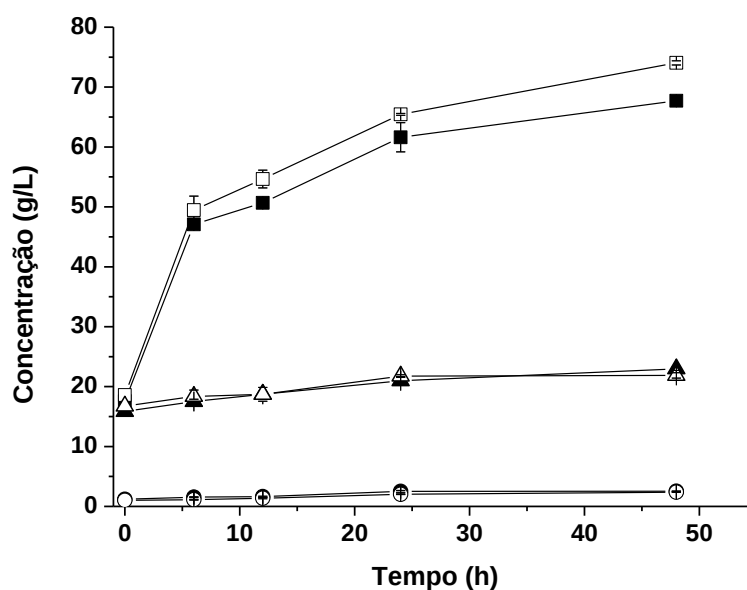


Figura 5. 4. Cinética de formação de carboidratos e ácidos orgânicos, para a biomassa seca (30% m/v), das variedades IPA-Sertânia e Orelha de elefante mexicana. Quadrado, triângulo e círculo correspondem a Glicose, xilose e ácido galacturônico, respectivamente. Símbolos cheios: IPA-Sertânia; Símbolos vazios: Orelha de elefante mexicana.

4.5 COMPARAÇÃO ENTRE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA SECA (10% M/V) E FRESCA, DE PALMA FORRAGEIRA

Realizou-se a hidrólise enzimática da biomassa fresca de palma forrageira, comparando-a com a biomassa seca, com carga de sólidos de 10% m/v, para ambas as biomassas. A Figura 5.5 compara as cinéticas de formação de glicose, xilose e ácido galacturônico, para a IPA-Sertânia. Em 12h, o hidrolisado já apresenta 26,72 g/L de glicose, para palma forrageira na condição fresca e, para a seca, 21,54 g/L, enquanto que, ao final da hidrólise, foram alcançados os valores de 29,72 g/L e 25,90 g/L, respectivamente. A partir da figura, também é possível verificar que há pouca diferença entre as concentrações de glicose com 24h e 48h. Com o objetivo de avaliar se haveria diferença significativa entre os valores de hexose obtidos, entre a biomassa fresca e seca, e se houve diferença entre os teores do mesmo composto, para 24h e 48h, foi aplicado o Teste “t” pareado, a 5%. O Teste informou que há diferença significativa para as duas condições de biomassa ($t = 16,28$; $p =$

0,04) e que, portanto, a variedade IPA-Sertânia libera maior quantidade de glicose, em cargas de 10% m/v, na condição de massa fresca, em detrimento da seca.

Avaliou-se o perfil de ácidos orgânicos e carboidratos, durante 48h, para a variedade Orelha de elefante mexicana (Figura 5.6). As concentrações de xilose e ácido galacturônico não variaram durante o intervalo analisado, repetindo o mesmo comportamento da hidrólise enzimática com 30% m/v de carga de biomassa. Para a glicose, o desempenho é oposto ao encontrado para a cultivar IPA-Sertânia, já que a biomassa seca (10% m/v) obteve maior concentração de hidratos de carbono que a fresca. Porém, quando realizado o Teste “t” pareado ($\alpha = 0,05$), não é apresentado diferença significativa entre esses valores ($t = -1,56$; $p = 0,36$).

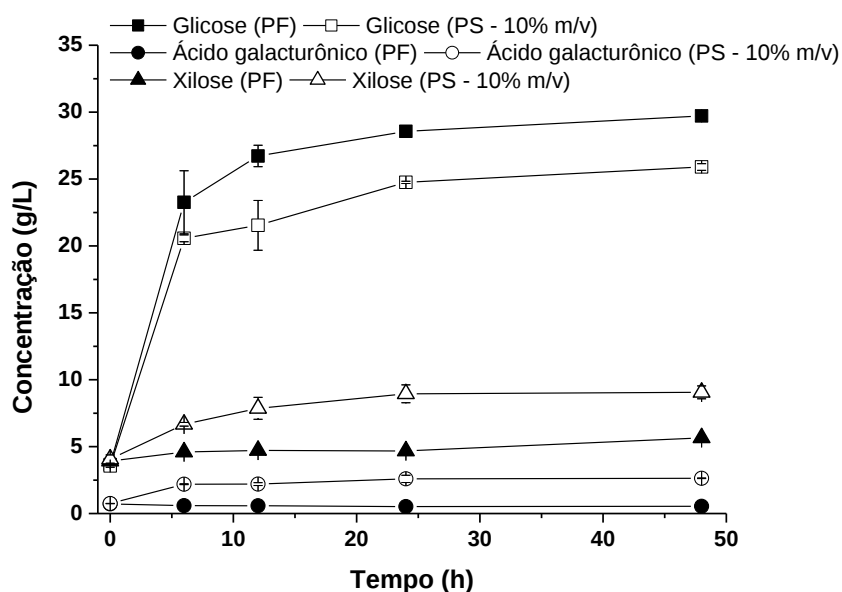


Figura 5. 5. Cinética de formação de carboidratos e ácidos orgânicos, para a biomassa seca (10% m/v) e fresca, da variedade IPA-Sertânia. PF – Palma fresca; PS – Palma seca.

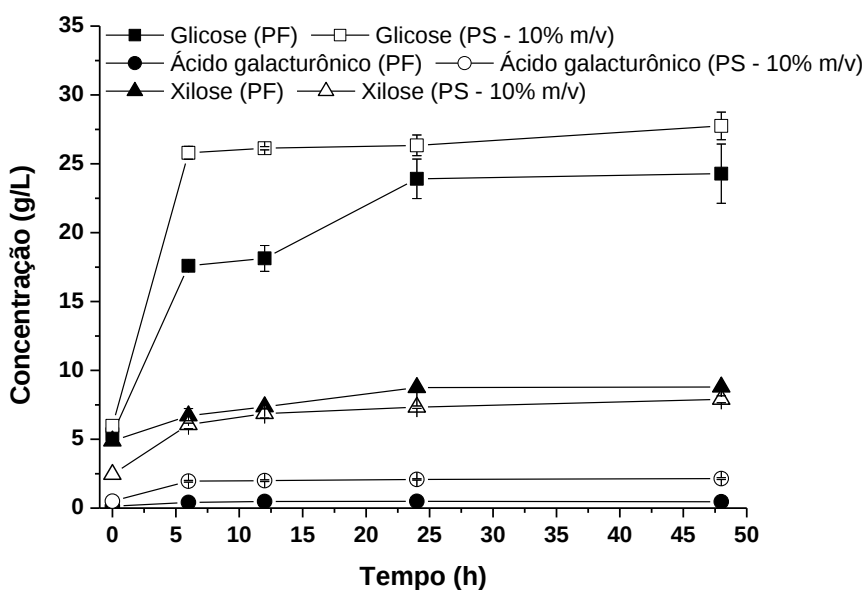


Figura 5. 6. Cinética de formação de carboidratos e ácidos orgânicos, para a biomassa seca (10% m/v) e fresca, da variedade Orelha de elefante mexicana. PF – Palma fresca; PS – Palma seca.

Em relação aos dados apresentados, através das Figuras 5.6 e 5.7, é notório que os teores de glicose, para a variedade IPA-Sertânia (29,72 g/L) são maiores que para a Orelha de elefante (24,28 g/L). A diferença entre os valores da hexose pode ser atribuída à diferença composicional das variedades, principalmente relacionado ao teor de lignina, que é maior em Orelha de elefante que na Sertânia. Porém, sob a ótica estatística, os valores não são significativamente diferentes, para o Teste “t” independente, a 5% ($t = -3,58$; $p = 0,07$). Isso indica que não há necessidade de fazer distinção entre as variedades analisadas, do ponto de vista industrial, já que o teor produzido, do principal carboidrato fermentativo, não é significativamente diferente para as cultivares analisadas. Isso viabiliza a diminuição da necessidade de mão-de-obra qualificada, capaz de distinguir os tipos de palma, no momento da coleta, já que não há diferença energética entre elas, além de ambas serem resistentes a cochonilha. Tais condições geram diminuição de custo para o dono da empresa, além de possibilitar emprego a uma maior quantidade de pessoas.

4.6 CINÉTICA DE SECAGEM E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA FRESCA DE PALMA FORRAGEIRA (30% M/V)

A cinética de secagem da biomassa fresca de palma forrageira forneceu as equações do modelo para cada uma das cultivares, para cada uma das temperaturas avaliadas (Figura 5.7). Em ambas as variedades, a 105°C, o tempo de secagem necessário para que a biomassa atinja a carga de 30% m/v é de 12h, enquanto que a 65°C, são aproximadamente 47h para IPA-Sertânia e 42h para a Orelha de elefante mexicana. O uso da temperatura a 105°C implica na redução de 75% do custo de energia elétrica de secagem da biomassa, além de diminuir o tempo de processamento da palma, quando comparado à hidrólise enzimática com a mesma carga de sólidos.

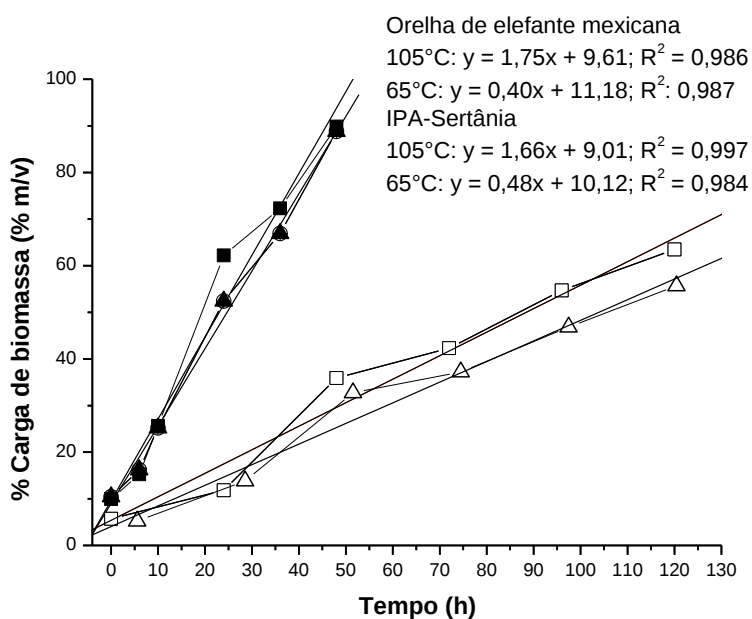


Figura 5. 7. Perfil de secagem da biomassa fresca de palma forrageira, para as variedades IPA-Sertânia e Orelha de elefante mexicana. Quadrado: IPA-Sertânia; Triângulo: Orelha de elefante mexicana. Símbolos cheios: 105°C; Símbolos vazios: 65°C.

Posteriormente, foi realizada a hidrólise enzimática da biomassa fresca de palma forrageira a 30% m/v, onde foram obtidos 65,30 g/L e 79,97 g/L de glicose, após 48h, para a IPA-Sertânia e a Orelha de Elefante Mexicana, respectivamente.

4.7 COMPARAÇÃO ENTRE A FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO ENZIMÁTICO DA BIOMASSA FRESCA E SECA, DE PALMA FORRAGEIRA, A 30% M/V

Com a finalidade de determinar o perfil cinético da produção de etanol e consumo de carboidratos dos hidrolisados enzimáticos, das variedades investigadas, foi realizada a fermentação, durante 8h. Esse procedimento, para os hidrolisados da biomassa seca (Figura 5.8A) de IPA-Sertânia e Orelha de elefante mexicana permitiu a produção de 26,71 g/L e 34,87g/L de etanol, enquanto que para o hidrolisado da biomassa fresca (Figura 5.8B), para ambas as variedades, foi de 29,39 g/L e 37,54 g/L, respectivamente. Xilose e ácido galacturônico não tiveram variação significativa durante essa etapa.

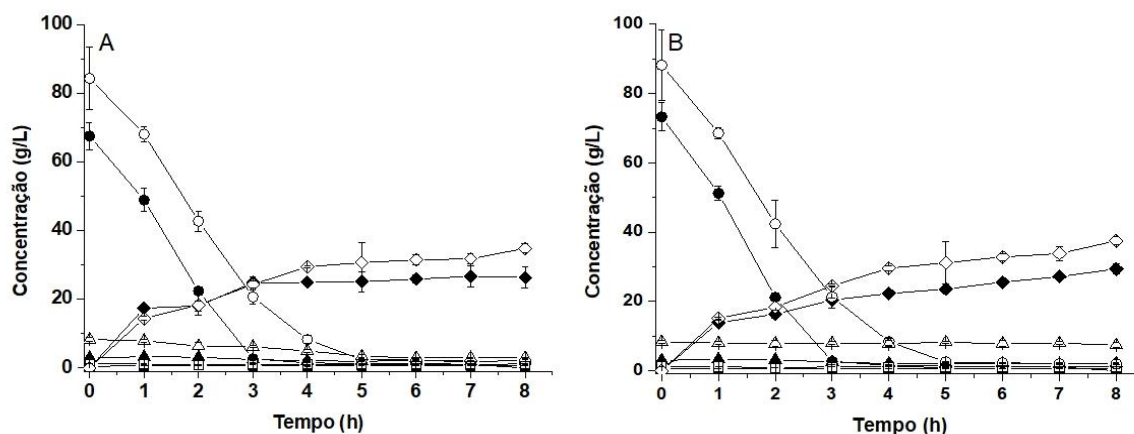


Figura 5. 8. Produção de etanol, a partir dos hidrolisados enzimáticos da biomassa seca (A) e fresca (B) das variedades de palma forrageira "IPA-Sertânia" e "Orelha de elefante mexicana", por *S. cerevisiae* (JP1). O quadrado, o triângulo, o círculo e o diamante correspondem ao ácido galacturônico, xilose, glicose e etanol. Símbolos cheios: IPA-Sertânia; Símbolos vazios: Orelha de elefante mexicana.

Os parâmetros fermentativos das fermentações, para as condições avaliadas, estão descritos na Tabela 5.9. Os valores referentes à biomassa fresca foram mais elevados, em detrimento dos de biomassa seca. Udeh e Erkurt (2017) realizaram a fermentação do hidrolisado enzimático (16h) de *Opuntia ficus-indica*, durante 16h, e obtiveram o $Y_{p/s} = 0,46$ g/g, $Q_p = 0,92$ g/L.h e E_f (%) = 88,03%. Já Souza-Filho et al. (2016), para *Nopalea cochenillifera*, obteve $Y_{p/s} = 0,49$ g/g e E_f (%) = 95,6%, em 48h.

A produtividade média da cultura de palma forrageira, no nordeste brasileiro é, aproximadamente, $85 \text{ ton.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$ (Santos et al., 2016), podendo alcançar valores de $500 \text{ ton.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$, no sistema adensado e em condições ótimas de cultivo, no Chile (Nobel et al., 1992). Considerando estes valores reportados na literatura, bem como os teores de glicose, conversão de celulose e parâmetros fermentativos, obtidos no presente trabalho, pode-se obter cerca de 2007-11235 $\text{L.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$, para a variedade IPA-Sertânia, e 2072-13446 $\text{L.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$, em Orelha de elefante mexicana, para $85 \text{ ton.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$ e $500 \text{ ton.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$, na biomassa seca de palma forrageira, respectivamente. Para a biomassa fresca, os valores foram maiores: 1995-12960 $\text{L.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$, para IPA-Sertânia, e 2357-15297 $\text{L.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$, para Orelha de elefante mexicana.

Tabela 5. 9. Parâmetros da fermentação dos hidrolisados enzimáticos de IPA-Sertânia e Orelha de elefante mexicana

Parâmetros fermentativos	IPA-Sertânia		Orelha de elefante mexicana	
	Biomassa Seca	Biomassa Fresca	Biomassa Seca	Biomassa Fresca
Y p/s (g/g)	0,39	0,40	0,42	0,43
Qp (g/L.h⁻¹)	3,30	3,67	4,36	4,69
Ef (%)	76,32	78,49	82,82	85,10
Etanol (g/L)	26,71	29,39	34,87	37,54
Glicose residual (g/L)	0,00	0,00	1,97	1,92

Y p/s = rendimento da produção de etanol, em relação ao consumo de carboidratos; Qp = produtividade volumétrica; Ef = eficiência de fermentação.

Porém, três importantes aspectos devem ser considerados, quando comparadas as fermentações realizadas pelo presente estudo e as de Udeh e Erkurt (2017) e Souza-Filho et al. (2016). Primeiramente, a literatura reportada utilizou baixos teores de carboidratos no sistema, o que representa menor pressão osmótica na levedura e problemas reológicos. Segundo, o período de fermentação foi 2 e 6 vezes maior que o do presente trabalho, resultando em menor produtividade (Q_p). E, por fim, o presente estudo não utilizou qualquer suplementação no meio de fermentação, enquanto que os demais utilizaram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e extrato de levedura, o que desencadeia aumento nos custos de processo.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho comprova que é possível produzir, a partir dos dados publicados de produtividade da cultura, entre 2000 e 15000 L de etanol.ha⁻¹.ano⁻¹, a partir da otimização da hidrólise enzimática da biomassa de palma forrageira. Ressalta-se que os baixos teores de lignina e de cristalinidade da celulose possibilitaram que a palma forrageira fosse hidrolisada sem a necessidade de pré-tratamento químico, gerando reduções de custo ao processo, bem como a não suplementação do meio de fermentação. Acrescenta-se a isso, que a carga de biomassa ideal, para a hidrólise enzimática, seja 30% m/v, provocando a redução de 75% do custo elétrico da etapa de secagem, ao comprovar que apenas 12h, em estufa a 105°C, são necessárias para atingir essa carga de sólidos, a partir da biomassa fresca da cultivar.

Uma análise de custo completa (que já esta sendo realizada no presente grupo de pesquisa) ainda é necessária para se atestar a total viabilidade deste processo. Mas, também é fato que tecnologias necessitam ser desenvolvidas (como coletadeiras adequadas para a plantação de palma forrageira, as quais já estão em atividade) para que, cada vez mais, esse processo seja viável e rentável, de modo que favoreça o desenvolvimento econômico e social da população vivente no semiárido nordestino.

REFERÊNCIAS

- AGBOR, Valery B. et al. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.
- ALENCAR, Bárbara Ribeiro Alves et al. Effect of tween-80 addition in dilute acid pretreatment of waste office paper on enzymatic hydrolysis for bioethanol production by SHF and SSF processes. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 51, p. 121-126, 2017b.
- ALENCAR, Bárbara Ribeiro Alves et al. Recycling the liquid fraction of alkaline hydrogen peroxide in the pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 928-935, 2017a.
- ALVIRA, Petal et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- AL-ZUHAIR, Sulaiman. The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4078-4085, 2008.
- ANDRIETTA, M. G. S. et al. Bioethanol-: Brazil, 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007.
- ARANTES, Valdeir; SADDLER, Jack N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, n. 1, p. 4, 2010.
- ASKDRBIRD. O que é a Análise de custo utilitário? **Askdrbird**, 2015. Disponível em: <<http://www.askdrbird.com/epV3YQvW.html>>. Acesso em: 13 mar. 2017.
- BANERJEE, Saumita et al. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, n. 1, p. 77-93, 2010.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.
- BINOD, Parameswaran et al. Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 109-116, 2012.
- BIZZO, Waldir Antonio et al. The generation of residual biomass during the production of bio-ethanol from sugarcane, its characterization and its use in energy production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 589-603, 2014.
- BUCHANAN, Bob B.; GRUISSEM, Wilhelm; JONES, Russell L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. John Wiley & Sons, 2015.

CALIARI, Ítalo P. et al. Estimation of cellulose crystallinity of sugarcane biomass using near infrared spectroscopy and multivariate analysis methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 158, p. 20-28, 2017.

CALLIARI, C. M. **Extração térmica, química e enzimática de pectina de bagaço de laranja. 90p.** 2004. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado—Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

CAO, Shuo; AITA, Giovanna M. Enzymatic hydrolysis and ethanol yields of combined surfactant and dilute ammonia treated sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 357-364, 2013.

CHANDEL, Anuj K. et al. Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid–base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 63, 2014.

CHANDRA, Richard P. et al. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?. In: **Biofuels**. Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 67-93.

CHEN, Qian et al. Improving production of bioethanol from Duckweed (*Landoltia punctata*) by pectinase pretreatment. **Energies**, v. 5, n. 8, p. 3019-3032, 2012.

CHIARELLO, Luana M. et al. Production of cellulosic ethanol from steam-exploded *Eucalyptus urograndis* and sugarcane bagasse at high total solids and low enzyme loadings. **Sustainable Chemical Processes**, v. 4, n. 1, p. 15, 2016.

CONAGIN, Armando. Delineamentos compostos centrais ortogonais, rotacionais e divisíveis em blocos. **Bragantia**, v. 41, n. 1, p. 49-56, 1982.

CUSHMAN, John C. et al. Development and use of bioenergy feedstocks for semi-arid and arid lands. **Journal of experimental botany**, p. 87, 2015.

DE SOUZA, Rafael Barros et al. Mineral composition of the sugarcane juice and its influence on the ethanol fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 209-222, 2015.

DING, Shi-You; HIMMEL, Michael E. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 597-606, 2006.

ELIANA, Cardona et al. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. **Fuel**, v. 118, p. 41-47, 2014.

ENZIMAS COMERCIAIS. **Resumos e Trabalhos**, 2016. Disponível em: <<http://www.resumosetrabalhos.com.br/enzimas-comerciais.html>>. Acesso em: 18 de Março de 2017.

ERIKSSON, Torny; BÖRJESSON, Johan; TJERNELD, Folke. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 353-364, 2002.

GALBE, Mats; ZACCHI, Guido. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 6, p. 618-628, 2002.

GAO, Hong et al. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 4012-4016, 2009.

GAO, Xiadi; KUMAR, Rajeev; WYMAN, Charles E. Fast hemicellulose quantification via a simple one-step acid hydrolysis. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 6, p. 1088-1096, 2014.

GAURAV, N. et al. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 205-214, 2017.

GHALI, Saeed N.; EL-FARAMAWY, Hoda S.; EISSA, Mamdouh M. Influence of boron additions on mechanical properties of carbon steel. **Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering**, v. 11, n. 10, p. 995, 2012.

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

GHOSH, P.; GHOSE, T. K.; SCHEPER, T. Em Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 85, 2003.

GIL, N. et al. Biorefinação–uso de enzimas no melhoramento da refinação de uma pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus*. **Tecnicelipa**, 2015. Disponível em: <<http://www.tecniceipa.com/files/Biorefinacao.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2017.

GÍRIO, Francisco M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

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

GULFI, Marianna; ARRIGONI, Eva; AMADÒ, Renato. In vitro fermentability of a pectin fraction rich in hairy regions. **Carbohydrate polymers**, v. 67, n. 3, p. 410-416, 2007.

HASHMI, Muzna et al. Comparison of autohydrolysis and ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium acetate pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 714-720, 2017.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

HODGE, David B. et al. Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 152, n. 1, p. 88, 2009.

HU, Fan; RAGAUSKAS, Art. Pretreatment and lignocellulosic chemistry. **Bioenergy Research**, v. 5, n. 4, p. 1043-1066, 2012.

- HUANG, Yeping et al. Efficient enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse pulp for ethanol production by cellulase from *Penicillium oxalicum* EU2106 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* ZM1-5. **Biomass and Bioenergy**, v. 77, p. 53-63, 2015.
- HULTIN, H. O.; SUN, BONNIE; BULGER, J. Pectin methyl esterases of the banana. Purification and properties. **Journal of Food Science**, v. 31, n. 3, p. 320-327, 1966.
- HUMBIRD, D. et al. **Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol: dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover**. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, CO., 2011.
- JAYANI, Ranveer Singh; SAXENA, Shivalika; GUPTA, Reena. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.
- JÚNIOR, J. C. B. D. et al. Potential of cactus pear in South America. **Cactusnet Newsletter**, Santiago del Estero, v. 13, ed. esp., p. 29-40, 2013.
- KASSAYE, Samuel; PANT, Kamal K.; JAIN, Sapna. Hydrolysis of cellulosic bamboo biomass into reducing sugars via a combined alkaline solution and ionic liquid pretreatment steps. **Renewable Energy**, v. 104, p. 177-184, 2017.
- KIM, Tae Hyun et al. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. **Bioresource Technology**, v. 90, n. 1, p. 39-47, 2003.
- KONDO, Tetsuo. The relationship between intramolecular hydrogen bonds and certain physical properties of regioselectively substituted cellulose derivatives. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 35, n. 4, p. 717-723, 1997.
- KULOYO, Olukayode O. et al. Opuntia ficus-indica cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 3173-3183, 2014.
- KUMAR, Rajeev; WYMAN, Charles E. Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 2, p. 252-267, 2009.
- KVIEN, Ingvald; TANEM, Bjørn S.; OKSMAN, Kristiina. Characterization of cellulose whiskers and their nanocomposites by atomic force and electron microscopy. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 3160-3165, 2005.
- LANGARO, Carina et al. Otimização do processo de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar por hidrólise enzimática com celulasas fúngicas. **Revista Tecnológica**, p. 53-62, 2015.
- LARSEN, Janet et al. The IBUS process—lignocellulosic bioethanol close to a commercial reality. **Chemical Engineering & Technology**, v. 31, n. 5, p. 765-772, 2008.
- LI, Jihong et al. The mechanism of poly (ethylene glycol) 4000 effect on enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, p. 203-210, 2012.

LIN, Xuliang et al. Effect of cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide on the enzymatic hydrolysis of cellulose. **Cellulose**, v. 24, n. 1, p. 61-68, 2017.

LIRA, Mário de Andrade et al. Utilização da palma forrageira na pecuária leiteira do semi-árido. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica. Recife: APCA**, p. 107-120, 2005.

LONG, Tanya M. et al. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5492-5500, 2012.

MALAININE, Mohamed E. et al. Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus-indica*. Cellulose extraction and characterisation. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, n. 1, p. 77-83, 2003.

MARQUES, S. et al. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 5, p. 400-406, 2008.

MEDINA, Jesus David Coral et al. Steam explosion pretreatment of oil palm empty fruit bunches (EFB) using autocatalytic hydrolysis: A biorefinery approach. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 173-180, 2016.

MENEGOL, Daiane et al. Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. **Energy Conversion and Management**, v. 88, p. 1252-1256, 2014.

MILÉO, Patrícia Câmara; ROCHA, George Jackson de Moraes; GONÇALVES, Adilson Roberto. Sugarcane Straw Reinforced Castor Oil Polyurethane Composites: Fiber Characterization and Analysis of Composite Properties. **Journal of Natural Fibers**, p. 1-12, 2016.

MODENBACH, Alicia A.; NOKES, Sue E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings—a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526-544, 2013.

MONSCHEIN, Mareike; NIDETZKY, Bernd. Effect of pretreatment severity in continuous steam explosion on enzymatic conversion of wheat straw: Evidence from kinetic analysis of hydrolysis time courses. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 287-296, 2016.

MOSIER, Nathan et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MOTHÉ, Cheila G.; DE MIRANDA, Iara C. Characterization of sugarcane and coconut fibers by thermal analysis and FTIR. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, n. 2, p. 661, 2009.

MOURA, Magna Soelma Beserra et al. Indicadores de eficiência do uso da água e de nutrientes de clones de palma forrageira em condições de sequeiro no Semiárido brasileiro. **Bragantia**, v. 73, n. 2, p. 184-191, 2014.

NETO, Alberto Brandão Torres. Estudo da pré-hidrólise ácida da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill). 2010. 47f. Dissertação (Mestrado em Engenharia

Agrícola) – Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

NETO, Benício Barros; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como fazer experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria**. Bookman, 2010.

NGUYEN, Nhu H. et al. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological research**, v. 110, n. 10, p. 1232-1241, 2006.

NOBEL, P. S.; GARCÍA-MOYA, E.; QUERO, E. High annual productivity of certain agaves and cacti under cultivation. **Plant, Cell & Environment**, v. 15, n. 3, p. 329-335, 1992.

OGEDA, Thais Lucy et al. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, Emídio Cantídio Almeida et al. Produtividade, eficiência de uso da água e qualidade tecnológica de cana-de-açúcar submetida a diferentes regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 6, p. 617-625, 2011.

OLSSON, Lisbeth; HAHN-HÄGERDAL, Bärbel. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial technology**, v. 18, n. 5, p. 312-331, 1996.

OUYANG, Jia et al. Enzymatic hydrolysis, adsorption, and recycling during hydrolysis of bagasse sulfite pulp. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 288-293, 2013.

PARK, Sunkyu et al. Research cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology Biofuels**, v. 3, n. 10, 2010.

PENG, Fenget al. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 879-903, 2012.

PENNA, Lúcia Barreto. Hidrocolóides: usos em alimentos. **Food ingredients**, v. 17, p. 58-64, 2002.

PINHEIRO, Eloísa Rovaris. Pectina da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*): otimização da extração com ácido cítrico e caracterização físico-química. Florianópolis, 2007. 79 f. **Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis**, 2007.

PINHEIRO, Karina Mendes et al. Correlações do índice de área do cladódio com características morfogênicas e produtivas da palma forrageira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 12, p. 939-947, 2014.

PU, Yunqiao; ZIEMER, Cherie; RAGAUSKAS, Arthur J. CP/MAS 13 C NMR analysis of cellulase treated bleached softwood kraft pulp. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 5, p. 591-597, 2006.

PU, Yunqiao et al. The new forestry biofuels sector. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, n. 1, p. 58-73, 2008.

PURI, Dhivya J.; HEAVEN, Sonia; BANKS, Charles J. Improving the performance of enzymes in hydrolysis of high solids paper pulp derived from MSW. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 107, 2013.

QI, Benkun et al. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2881-2889, 2011.

QI, Benkun; CHEN, Xiangrong; WAN, Yinhua. Pretreatment of wheat straw by nonionic surfactant-assisted dilute acid for enhancing enzymatic hydrolysis and ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4875-4883, 2010.

QUEIROZ, Maria G. et al. Características morfofisiológicas e produtividade da palma forrageira em diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 10, p. 931-938, 2015.

RABELO, Sarita Cândida et al. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, v. 136, p. 349-357, 2014.

RABELO, Sarita Cândida et al. Enhancement of the enzymatic digestibility of sugarcane bagasse by steam pretreatment impregnated with hydrogen peroxide. **Biotechnology Progress**, v. 28, n. 5, p. 1207-1217, 2012.

RAJAN, Kalavathy; CARRIER, Danielle Julie. Effect of dilute acid pretreatment conditions and washing on the production of inhibitors and on recovery of sugars during wheat straw enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 62, p. 222-227, 2014.

REIS, Alexandre Libanio Silva et al. Second-generation ethanol from sugarcane and sweet sorghum bagasses using the yeast *Dekkera bruxellensis*. **Industrial Crops and Products**, v. 92, p. 255-262, 2016.

REPSOL S.A. Matriz Energética Mundial. **REPSOL**, 2015. Disponível em: <https://www.repsol.com/pt_pt/corporacion/conocer-repsol/contexto-energetico/matriz-energetica-mundial/>. Acesso em: 28 mai. 2017.

ROCHA, Jessica Maria Thayane Sales et al. Enzymatic hydrolysis of waste office paper for ethanol production by *Spathaspora passalidarum*. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 50, n. 2, p. 243-246, 2016.

SAMPAIO, E. V. S. B. Fisiologia da palma. In: MENEZES, R. S. C. et al. **A palma no Nordeste do Brasil: conhecimento atual e novas perspectivas de uso**. 1ª ed. Recife: Editora Universitária da UFPE, 2005, p. 43-55.

SANGLARD, D. A.; MELO, G. G. **Pesquisas com palma forrageira: panorama atual**. 2012. Disponível em: <<http://www.cdsa.ufcg.edu.br/portal/index.php>>. Acesso em: 12 mar. 2017.

SANTOS, Fernando et al. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 56-62, 2014.

SANTOS, Taciana Nascimento et al. Potential for biofuels from the biomass of prickly pear cladodes: Challenges for bioethanol and biogas production in dry areas. **Biomass and Bioenergy**, v. 85, p. 215-222, 2016.

SANTOS, Tamires Carvalho et al. Quantificação da atividade de CMCase e FPase produzidas a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira. **Revista Científica do Departamento de Química e Exatas**, v. 2, n. 2, p. 22-29, 2011.

SILVA, Cristina Cavalcante Félix; SANTOS, Luciana Carvalho. Palma Forrageira (*Opuntia Ficus-Indica* Mill) como alternativa na alimentação de ruminantes. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 7, n. 10, p. 1-13, 2006.

SILVA, Laerte Marques et al. Produtividade da palma forrageira cultivada em diferentes densidades de plantio. **Ciência Rural**, v. 44, n. 11, p. 2064-2071, 2014.

SOMERVILLE, Chris et al. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. **Science**, v. 306, n. 5705, p. 2206-2211, 2004.

SOUZA-FILHO, Pedro Ferreira et al. Simultaneous saccharification and fermentation of cactus pear biomass—evaluation of using different pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 425-433, 2016.

STEPHENS, Catherine et al. Hydrolysis of the amorphous cellulose in cotton-based paper. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 4, p. 1093-1099, 2008.

SUBHEDAR, Preeti B.; BABU, Narmadha R.; GOGATE, Parag R. Intensification of enzymatic hydrolysis of waste newspaper using ultrasound for fermentable sugar production. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 22, p. 326-332, 2015.

SURIYACHAI, Nopparat et al. Optimized simultaneous saccharification and co-fermentation of rice straw for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture using design of experiments. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 171-178, 2013.

TILLOY, Valentin; ORTIZ-JULIEN, Anne; DEQUIN, Sylvie. Reduction of ethanol yield and improvement of glycerol formation by adaptive evolution of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* under hyperosmotic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2623-2632, 2014.

TOQUERO, Cristina; BOLADO, Silvia. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 68-76, 2014.

UDEH, Benard Anayo; ERKURT, Emrah Ahmet. Compositional and structural changes in *Phoenix canariensis* and *Opuntia ficus-indica* with pretreatment: Effects on enzymatic hydrolysis and second generation ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 702-707, 2017.

UM, Byung-Hwan; HANLEY, Thomas R. A comparison of simple rheological parameters and simulation data for *Zymomonas mobilis* fermentation broths with high substrate loading in a 3-L bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 145, n. 1-3, p. 29-38, 2008.

VAN SOEST, PJ van; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

- VANDENBRINK, Joshua P. et al. Analysis of crystallinity index and hydrolysis rates in the bioenergy crop *Sorghum bicolor*. **BioEnergy Research**, v. 5, n. 2, p. 387-397, 2012.
- VASCONCELOS, Augusto et al. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius sp*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 5, p. 827-831, 2009.
- WAGHMARE, Pankajkumar R. et al. Enzymatic hydrolysis and characterization of waste lignocellulosic biomass produced after dye bioremediation under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 136-141, 2014.
- WANG, Lei; TEMPLER, Richard; MURPHY, Richard J. High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. **Applied Energy**, v. 99, p. 23-31, 2012.
- WEISS, Noah D.; FARMER, Joseph D.; SCHELL, Daniel J. Impact of corn stover composition on hemicellulose conversion during dilute acid pretreatment and enzymatic cellulose digestibility of the pretreated solids. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 674-678, 2010.
- WILLATS, William GT; KNOX, J. Paul; MIKKELSEN, Jørn Dalgaard. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97-104, 2006.
- WU, Fang-Chen; HUANG, Shu-Sing; SHIH, Lung. Sequential hydrolysis of waste newspaper and bioethanol production from the hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 159-168, 2014.
- WYMAN, Charles. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **TRENDS in Biotechnology**, v. 25, n° 4, p. 153-157, 2007.
- XIAO, Zhizhuang et al. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. In: **Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO**. Humana Press, p. 1115-1126, 2004.
- XU, Feng et al. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: a mini-review. **Applied Energy**, v. 104, p. 801-809, 2013.
- YANG, Lisha et al. Biomass characterization of *Agave* and *Opuntia* as potential biofuel feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v. 76, p. 43-53, 2015.
- YANG, Ming et al. Co-fermentation of hemicellulose and starch from barley straw and grain for efficient pentoses utilization in acetone–butanol–ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 128-135, 2015.
- YU, Xiaoxiao et al. Optimization of enzyme complexes for efficient hydrolysis of corn stover to produce glucose. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, 2015.

ZHANG, Hongdan et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse with ferric chloride pretreatment and surfactant. **Bioresource Technology**, 2017.

ZHANG, Junhua; PAKARINEN, Annukka; VIKARI, Liisa. Synergy between cellulases and pectinases in the hydrolysis of hemp. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 302-307, 2013.

ZHANG, Xin; YUAN, Qipeng; CHENG, Gang. Deconstruction of corncob by steam explosion pretreatment: Correlations between sugar conversion and recalcitrant structures. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 351-356, 2017.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA BIORESOURCE TECHNOLOGY

Bioresource Technology 250 (2018) 273–280



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech



Enzymatic hydrolysis of cactus pear varieties with high solids loading for bioethanol production



Bárbara Ribeiro Alves Alencar^a, Emmanuel Damilano Dutra^b,
Everardo Valadares de Sá Barretto Sampaio^b, Rômulo Simões Cezar Menezes^{b,*},
Marcos Antônio Moraes Jr.^a

^a Interdepartmental Research Group in Metabolic Engineering, Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Research Group on Biomass Energy, Department of Nuclear Energy, Federal University of Pernambuco, 50740-540 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Energy crops
Prickly pear
Water efficiency use
Pretreatment costs
Alcoholic fermentation

ABSTRACT

The optimization of enzymatic hydrolysis, with high solids loading, of two species of cactus pear for bioethanol production was tested evaluating the influence of surfactant Tween 80 and pretreatment with H₂O and H₂SO₄ (1% v/v) (50 °C, 150 rpm, 3 h). XRD and FTIR analyzes were performed. Afterwards, the influence of the factors cellulase (FPU g⁻¹), pectinase (U g⁻¹) and solids load (% w/v), on the hydrolysis of varieties (50 °C, 150 rpm, 48 h), and the fermentation of the optimal point (33 °C, 8 h) were evaluated. The pretreatments and the Tween 80 did not increase the hydrolysis yields and Rotacional Central Compound Design indicated that the pectinase factor was not significant. The best cellulase and solids load conditions were 10 FPU g⁻¹ of biomass and 30% w/v for both species. The fermentation efficiency of hydrolysates for *Nopalea cochenillifera* and *Opuntia ficus-indica* were 76.3% and 82.8%, respectively, showing their potential for bioethanol production.

1. Introduction

Population growth based on continued economic development using fossil fuels to meet growing energy needs has generated a number of environmental problems, mainly related to greenhouse gas emissions and climate changes (Gaurav et al., 2017). Biofuel production has been stimulated as a way to circumvent such a scenario (Gupta and Verma, 2015). United States of America and Brazil are the two world's largest biofuel producers, accounting for 41.4% and 23.6% of world production, respectively, in 2015, mainly using agricultural crops such as corn and sugarcane (BP Global, 2016).

Biomass cultivation has been greatly affected by climate changes, mainly due to global warming, which is responsible for water reserve decreases on the planet (Gosling and Arnell, 2016) and future scenarios tend to be worse: it is estimated that the world's water reserves will decrease by 40% in 2030 and by 55% in 2050 (UNESCO, 2015). Therefore, the amount of arid and semi-arid regions in the world will increase beyond the present one third of the terrestrial global area (Silva et al., 2014). In Brazil, the semiarid zone occupies between 750 and 850 thousand km², which is equivalent to about 10% of the national territory and 50% of the area of the northeastern region. This region is characterized by scarce and irregular rainfall, high annual

evaporation and shallow soils with low moisture retention capacity, influencing biomass availability and quality (Silva et al., 2014).

Water availability decreases directly affect C3 (3-phosphoglyceric acid fixatives) and C4 crops (oxalacetate fixatives). Crassulaceae acid metabolism (CAM) fixatives, on the other hand, are much more resistant to low water availability (Cushman et al., 2015; Davis et al., 2017) and may be suitable for future biomass and energy production. Cactus pear (Cactaceae) is a good option, since it is highly adapted to dry and arid climates, it is highly water use efficient and it has high biomass productivity, rich in carbohydrate contents, either fibrous or non-fibrous (Silva et al., 2014). It has been predicted that, due to climate change, the area suitable for the production of this plant will increase from 697 thousand to 1,093 thousand km² in Brazil, over the next century. In this scenario, cactus pear emerge as alternative energy crop. It can be used for a variety of purposes: ruminant and human feeding; production of pharmaceuticals, cosmetics and dyes; soil conservation and recovery; live fences and landscaping; and also biofuel production (Bensadón et al., 2010; Santos et al., 2016). Recent estimates indicate that one ha of this plant can produce enough electricity through methane production to supply two houses, for one year, with an average consumption of 250 kWh (Santos et al., 2016).

In the current scenario for biofuel production from lignocellulosic

* Corresponding author at: Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50740-540 Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail address: rmenezes@ufpe.br (R.S.C. Menezes).

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.042>

Received 5 October 2017; Received in revised form 7 November 2017; Accepted 13 November 2017

Available online 15 November 2017

0960-8524/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

biomass, some kind of pretreatment is used (physical, chemical, biological) in order to obtain fermentable carbohydrates. The emergence of new technologies, including cost reduction in the pretreatment stage through recycling of liquid fractions (Cheng et al., 2008; Rocha et al., 2014; Li et al., 2015; Alencar et al., 2017a), has made possible the use of other strategies of enzymatic hydrolysis, such as reduction of the enzymatic load and increase of the biomass load, which lead to a higher concentration of monosaccharides (Chiarello et al., 2016).

Studies have been undertaken with the purpose of producing bioethanol from cactus pear (Kuloyo et al., 2014; Santos et al., 2016; Souza-Filho et al., 2016; Udeh and Erkurt, 2017). They are characterized by acid and/or alkaline pretreatment of biomass, and enzymatic hydrolysis with low solid loading (10% w/v), in addition to using varieties that are not resistant to carmine cochineal, the main disease that affects this type of crop (FAO, 2017). In this context, the main aim of the present study was the optimization of the enzymatic hydrolysis stage with high solid loading without any type of biomass chemical pretreatment, with the objective of reducing process costs, for two resistant varieties to carmine cochineal.

2. Material and methods

2.1. Cactus pear biomass characterization

Cladodes of the two cactus pear species, *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm Dyck, “IPA-Sertânia” variety, and *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. “Orelha de elefante mexicana” variety, were harvested in the field of the Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA – Caruaru - PE - Brazil). They were washed with distilled water to remove soil and impurities and cut into cubes which were oven dried at 105 °C for 48 h. After dried, cactus pear samples were ground in a wiley mill and stored at room temperature. Fractions that passed through 10 mesh sieve were collected for physical-chemical characterization (Gouveia et al., 2009) and pretreatment.

2.2. Cactus pear pretreatment

The initial tests were performed only for *N. cochenillifera*, “IPA-Sertânia” variety. The biomass was pretreated with dilute sulfuric acid to evaluate the pretreatment efficiency in increasing the conversion of cellulose to glucose in the enzymatic hydrolysis. They were carried out with 35 mL of distilled water or aqueous solution of H₂SO₄ (1% v/v) in erlenmeyer flasks (125 mL), containing 5 g of the biomass (12.5% w/v). The biomass was agitated with the water or acid solution, for 3 h at 50 °C, on a shaker rotating at 150 rpm. Subsequently, the suspension was filtered on qualitative filter paper and the liquid fraction was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The procedure was performed in triplicate, for each type of pretreatment and analyzed following a completely randomized design model.

2.3. Enzymatic hydrolysis of cactus pear biomass

To obtain fermentable carbohydrates, the untreated, pretreated in water and pretreated in the acid solution (1% v/v) *N. cochenillifera* biomass was hydrolyzed by the enzymatic complex Celluclast™ 1.5 L – Novozymes (6.39 FPU mL⁻¹) and Polyfruit™ (2.37 U mL⁻¹). To verify pretreatment efficiency, the solid fraction from the initial pretreatment tests was subjected to enzymatic hydrolysis with high solids loading (25% m/V), where 5 g of pretreated biomass was transferred to erlenmeyer (50 mL) together with Celluclast™ and Polyfruit™ enzyme complexes, with loads of 7.5 FPU g⁻¹ and 0.47 U g⁻¹ biomass, respectively. Reaction volume was completed to 20 mL with 8 mL of citrate buffer (pH 4.8). The erlenmeyers were shaken at 150 rpm in a rotary incubator for 48 h at 50 °C. Under the same conditions, enzymatic hydrolysis of the pretreated and untreated biomass were performed in the presence of the surfactant Tween 80 (2.5 g L⁻¹). Since the high solids loading

Table 1

Rotational Central Compound Design (RCCD) applied to IPA-Sertânia and “Orelha de elefante mexicana” cactus pear varieties biomass.

Assays	Cellulase (FPU/g)	Pectinase (U/g)	Solids load (% w/v)
1	5.00	0.40	20.00
2	5.00	0.40	30.00
3	5.00	0.59	20.00
4	5.00	0.59	30.00
5	10.00	0.40	20.00
6	10.00	0.40	30.00
7	10.00	0.59	20.00
8	10.00	0.59	30.00
9	3.17	0.47	25.00
10	11.83	0.47	25.00
11	7.50	0.35	25.00
12	7.50	0.71	25.00
13	7.50	0.47	16.60
14	7.50	0.47	33.40
15 (CP)	7.50	0.47	25.00
16 (CP)	7.50	0.47	25.00
17 (CP)	7.50	0.47	25.00

CP – Central point.

used prevented the formation of a liquid fraction, 20 mL of distilled water were added, at the end of the hydrolysis for solubilization of the released sugars and further analyses by HPLC. This whole hydrolysis procedure was performed in triplicate.

From the results obtained by the initial tests with *N. cochenillifera*, described above, hydrolysis without pretreatment and surfactant of the biomass of the two species were tested with different levels of cellulase loads (FPU g⁻¹ of biomass), pectinase (U g⁻¹ of biomass) and solids load (% w/v), using a Rotational Central Compound Design (RCCD), 2³ + 3 (0), including the original levels of cellulase, pectinase and solids load and also levels determined as the central points (Table 1). Assays were performed for 48 h, at 150 rpm and 50 °C, in a completely randomized design, with three replicates only at the central point.

Subsequently, a study of the enzymatic hydrolysis of the two species was carried out at 0, 6, 12, 24 and 48 h. This procedure was performed only for the conditions determined by the RCCD assay 6 without pectinase (cellulase, 10 FPU g⁻¹ of biomass; solids load, 30% w/v) at 150 rpm and 50 °C. The assays were performed in duplicate, also in a completely randomized design.

Cellulose conversion of all assays was determined from Eq. (1).

$$\%C_c = \frac{G(gL^{-1})}{[1.11 * (\frac{\%C}{100}) * S_i(gL^{-1})]} \quad (1)$$

where %C_c corresponds to cellulose conversion to glucose, G to glucose concentration, %C to percentage of cellulose in biomass and S_i to solids load in the system.

2.4. Cactus pear enzymatic hydrolyzate fermentation

Saccharomyces cerevisiae, strain JP1, was cultivated in YPD medium (glucose, 20 g L⁻¹, peptone, 20 g L⁻¹; yeast extract, 10 g L⁻¹) in erlenmeyer flasks (1 L) with agitation at 150 rpm, for 24 h and 33 °C. In order to obtain 56 g of yeast biomass, the volumes of the culture medium were duplicated every 24 h for one week. At the end of this step, the cells were collected by centrifugation (10,000 rpm, 5 min), resuspended in NaCl solution (0.08%) and kept at 4 °C for 24 h. The cells were centrifuged again (10,000 rpm, 5 min) and 7 g of biomass were resuspended in 63 mL of cactus pear enzymatic hydrolyzate, obtained according to assay conditions 6 without pectinase for both cactus pear species. For this purpose, the enzymatic hydrolyzate was previously diluted twice in a glucose solution, with the same concentration of the original hydrolyzate, in order to decrease the density of the medium, due to the high viscosity of the enzymatic hydrolyzate. The

diluted hydrolysate with *S. cerevisiae* (10% w/v) was statically incubated for 8 h at 33 °C. Aliquots of 0.5 mL were separated every one hour. Samples, duly filtered, were analyzed by high performance liquid chromatography for carbohydrate and ethanol contents. The procedure was performed in triplicate, for the hydrolysates of the two cactus species.

The yields of the ethanol production (Y), as well as the volumetric productivity (Qp) and fermentation efficiency (Ef) were determined according Eqs. 2–4, respectively:

$$Y = \frac{\Delta E_{tOH} (g L^{-1})}{\Delta G (g L^{-1})} \quad (2)$$

$$Qp = \frac{E_{tOH} (g L^{-1})}{t (h)} \quad (3)$$

$$Ef = \frac{Y}{0.511} * 100 \quad (4)$$

where E_{tOH} refers to ethanol concentration, G to glucose concentration, t to fermentation time and 0.511 to the maximum theoretical ethanol yield per gram of glucose consumed.

2.5. Analytical methods

2.5.1. Chemical analysis

Carbohydrates (glucose, xylose, arabinose), organic acids (acetic, oxalic, galacturonic and formic) and ethanol quantifications was made by high performance liquid chromatography (HPLC), detected by refractive index (oven at 60 °C) on a Aminex® column (HPX-87H, Bio-Rad, USA), with a flow rate of 0.6 mL/min, at 60 °C, using H_2SO_4 (5 mM) as the mobile phase.

2.5.2. Structural analysis

Dried biomass structural analyzes, with and without pretreatment, were carried out by X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). XRD analyzes were performed in an Advanced Bruker diffractometer, model D8, with a scanning angle of 10° to 50° (Bragg 2θ angle), at increments of 0.02°, and counting for 1 s. The crystallinity index of the biomass was calculated according to Eq. (5):

$$I_{Cr} (\%) = \frac{I_{crystalline} - I_{amorphous}}{I_{crystalline}} * 100 \quad (5)$$

where I_{Cr} corresponds to the crystallinity index, $I_{crystalline}$ to the intensity value at the angle 21° and $I_{amorphous}$ to the intensity value at the angle 18.8°. Fourier transform infra-red spectroscopy analyzes were performed on a Bruker Spectroscopy, in the spectral range of 4500–600 cm^{-1} with a 4 cm^{-1} resolution and 16 scans.

2.5.3. Data treatment

Statistical analysis between the enzymatic hydrolysis of treatments with and without pretreatment, as well as with Tween 80, was performed through the Paired Student *t*-Test ($\alpha = 0.05$), in the Origin 6.0 software. The fit of the DCCR model, for the proposed Design matrix, was determined through analysis of variance ($\alpha = 0.05$), in the Statistic 7.0 software, as well as response surface.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the lignocellulosic biomass

Biomasses of both cactus species had similar concentration of hemicellulose, lignin, extractives and ash but slightly differed in relation to cellulose concentrations (Table 2). The variety “Orelha de elefante mexicana” of *O. ficus-indica* had 39% of fibrous carbohydrates, a proportion close to that of the “Algerian” variety (42%) of the same species (Kuloyo et al., 2014). On the other hand, *N. cochenillifera* “IPA-

Sertânia” variety had a cellulose concentration of 25.8%, lower than measured here for *O. ficus-indica* in this work (Table 2) and lower than that recently reported by Souza-Filho et al. (2016) that contained one 31.6% of this fraction. Lignin concentrations (7.1 and 5.8%) corresponded to about half of the values found by Souza-Filho et al. (2016): *O. ficus-indica* 15.7% and *N. cochenillifera* 10.3%. In contrast, the literature also reports concentrations of lignin in *O. ficus-indica* ranging from 3.6% (Malainine et al., 2003) to 7.9% (Kuloyo et al., 2014). Ashes contents (both about 11%; Table 2) were higher than those (6.0 and 5.4%) reported by (Souza-Filho et al., 2016) but that of *O. ficus-indica* was lower than the ones found by Kuloyo et al. (2014) and Malainine et al. (2003) for the same species: 16.8 and 19.6%, respectively. The discrepancies might be related to the climatic and soil conditions under which the plants were grown, to the plant densities in the crop stand and to the maturity stage of the plants and the cladodes (FAO, 2017), and might also be related to differences in methodology.

3.2. Acid and aqueous pretreatment and tween 80 addition influence in the enzymatic hydrolysis

Table 3 shows the concentrations of carbohydrates and organic acids of enzymatic hydrolysates of untreated and pretreated (water or sulfuric acid) biomass of pear cactus for the variety “IPA-Sertânia”. The assay performed with untreated biomass presented higher glucose concentration than those pretreated biomass, either with water or sulfuric acid. It indicates that cactus pear biomass may not require chemical pretreatments, even those less aggressive with water. The increase in glucose concentration from the untreated biomass is in disagreement with the findings reported by Ghosh et al. (2003), in which glucose yield was less than 20% in the absence of pretreatment. The authors also reported that cellulose conversion was higher than 90% when the biomass was pretreated. This controversy can be explained by the differences in structural characteristics of the biomass (see Section 3.2.1)

These results may represent a step forward in the direction of cost reduction or elimination, since pretreatment of lignocellulosic biomass accounts for 16–30% of ethanol production costs (Mosier et al., 2005; Humbird et al., 2011). Another factor that negatively affect the use of chemical pretreatment in this biomass is the loss of carbohydrate in the liquid fraction at this stage, meaning reduction of energy potential from biomass for the production of ethanol. The galacturonic acid, glucose and xylose concentrations, $2.06 \pm 0.13 g L^{-1}$, $15.47 \pm 0.31 g L^{-1}$ and $14.86 \pm 0.92 g L^{-1}$ were determined, in the liquid fraction, of the pretreatment with water, and $2.38 \pm 0.04 g L^{-1}$, $18.90 \pm 0.57 g L^{-1}$ and $20.08 \pm 0.55 g L^{-1}$, for pretreatment with sulfuric acid (1% v/v), respectively. It worth noting that the concentration of glucose and xylose in the aqueous pretreatment is lower than detected for sulfuric acid pretreatment. This was rather expected since the acid at this concentration easily remove amorphous cellulose content more efficiently than water. There was no difference in galacturonic acid concentration for both treatments. Similar profile was described by Kuloyo et al. (2014), who obtained $7.4 g L^{-1}$ glucose by pretreating dry “Algerian” biomass (*O. ficus-indica*) with dilute sulfuric acid (1.5% w/w). This is in line with the current idea that pretreatment helps disorganizing the lignocellulosic structure without releasing carbohydrates during this process, or does it at lower level (Chandra et al., 2007). Chemical pretreatments, in addition to representing a higher cost in the production of biofuels, result in loss of biomass, and consequently fermentation potential, by the wash-out of carbohydrates in this stage. This statement corroborated the findings that pretreatments should be considered in terms of their impact on the cost of processing steps and on the compensation of operational, capital and biomass costs (Mosier et al., 2005).

Table 3 also shows the assays performed in the presence of Tween 80 as surfactant of the system. The values analyzed showed that there is no statistical difference (paired *t*-test; $\alpha = 0.05$) in hexose

Table 2

Characterization of the dry biomass of “IPA-Sertânia” and “Orelha de elefante mexicana” cactus pear varieties.

Compounds	“IPA-Sertânia” (<i>Nopalea cochenillifera</i>)	(<i>Nopalea cochenillifera</i>) Souza-Filho et al. (2016)	“Orelha de elefante mexicana” (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	“Algerian” (<i>Opuntia ficus-indica</i>) Kuloyo et al. (2014)	(<i>Opuntia ficus-indica</i>) Souza-Filho et al. (2016)
Cellulose (%)	25.85 ± 0.01	31.60 ± 2.30	28.51 ± 0.06	23.01 ± 1.13	34.90 ± 0.30
Hemicellulose (%)	9.08 ± 0.02	17.10 ± 1.20	10.59 ± 0.02	14.10 ± 0.04	20.00 ± 1.30
Lignin (%)	5.77 ± 0.32	10.30 ± 0.50	6.40 ± 0.28	7.09 ± 0.08	15.70 ± 0.20
Extractives (%)	30.73 ± 1.45	26.90 ± 2.30	31.03 ± 1.65	24.30 ± 1.11	9.70 ± 0.60
Ashes (%)	11.65 ± 0.47	5.40 ± 0.02	11.15 ± 0.95	16.80 ± 0.20	6.00 ± 1.20
Total (%)	85.76	91.20	90.62	85.30	86.20

Table 3

Acid and aqueous pretreatment and Tween 80 influence on the enzymatic hydrolysis, performed according to conditions of central points from RCCD, of IPA-Sertânia cactus pear variety.

Treatments	Compounds	Without Tween 80		With Tween 80	
		C (g/L ⁻¹)	%C	C (g/L ⁻¹)	%C
Without PT	Galacturonic acid	1.65 ± 0.03	1.67	1.85 ± 0.38	2.40
	Glucose	68.83 ± 2.90	75.20	70.58 ± 0.74	77.63
	Xylose	22.00 ± 0.70	5.63	23.27 ± 0.71	10.59
	Formic acid	2.74 ± 0.32	0.37	5.32 ± 0.71	1.51
H ₂ O	Galacturonic acid	1.44 ± 0.56	1.46	2.28 ± 0.21	2.96
	Glucose	53.45 ± 1.50	64.46	60.12 ± 2.35	73.76
	Xylose	21.33 ± 0.01	5.43	23.61 ± 0.07	10.74
	Formic acid	6.03 ± 0.10	1.82	10.65 ± 1.24	3.85
H ₂ SO ₄ ^a	Galacturonic acid	1.39 ± 0.23	1.40	1.40 ± 0.08	1.81
	Glucose	45.89 ± 1.21	56.34	48.69 ± 1.42	60.24
	Xylose	21.26 ± 1.42	5.44	21.94 ± 0.90	9.98

PT – Pretreatment; ^a Sulfuric acid solution (1% v/v); C (g/L⁻¹) – Compound concentration; %C – Compound conversion rate.

concentrations from assays in the presence or absence of the surfactant (without pretreatment: $t = -0.52149$, $p = .65402$; water pretreatment: $t = -2.47794$, $p = .24419$; sulfuric acid pretreatment (1% v/v): $t = -2.09385$, $p = .28365$). It has been reported that non-ionic surfactants, such as Tween 80, have the ability to increase yields in the conversion of carbohydrates in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. It can be explained by the diminishing of unproductive binding of the enzyme to lignin, making enzymes more prone to react with the cellulosic matrix without affecting its activity (Eriksson et al., 2002; Li et al., 2012). Besides, Cao and Aita (2013) observed that the use of surfactant potentiates digestibility and alters the crystallinity of the cellulosic portion of the material, turning the enzyme to become more hydrophilic, and facilitating its interaction with the homopolymer. Studies developed with biomasses such as elephant grass, paper, wheat straw, sugarcane bagasse and corn straw presented better enzymatic adsorption to the cellulosic matrix, and, consequently, increased glucose formation by 50% (Qi et al., 2011; Menegol et al., 2014; Yu et al., 2015; Zhang et al., 2017; Alencar et al., 2017b). However, since cactus pear presents low lignin content (Table 2) and cellulose crystallinity (Section 3.2.1), the presence of Tween 80 was not relevant to the process.

3.2.1. XRD and FTIR

Pretreatments aim to remove lignin and cause disorganization, mainly, of the crystalline cellulose structure. The present analyses showed that cactus pear varieties evaluated presented low cellulose crystallinity (IC%) levels, which are $5.24 \pm 0.20\%$ for “IPA-Sertânia” and $7.14 \pm 1.32\%$ for “Orelha de elefante Mexicana”. It made pretreatments of any kind less relevant than it is for other biomasses, as reported above. Yang et al. (2015) reported that cellulose content of cactus pear is 80% amorphous and β -crystalline, thus it could be more easily converted into fermentable carbohydrates compared to traditional herbaceous or woody biomasses. When compared to other types

of biomass, the cactus pear has lower values of this parameter. *Sorghum bicolor* presents crystallinity contents between 32 and 45%, depending on the variety, whereas, for sugarcane bagasse, this value corresponds to 50% in biomass without pretreatment (Vandenbrink et al., 2012; Calari et al., 2017). Crystallinity index (IC%) of sugarcane bagasse is almost 10 times greater than that of cactus pear, thus indicating the necessity for pretreatment. Despite the “softer” structure of the biomass, we evaluated eventual changes that could occur in cellulose crystallinity after pretreating the biomasses. The biomass pretreated with water presented IC% of 10.42%. This parameter increased to 14.83% when pretreated with acid. The increase of cellulose crystallinity in pretreated biomass has been reported in literature (Chandel et al., 2014; Alencar et al., 2017a).

FTIR analysis revealed that the main differences of absorbances were in the region of 3000 and 3600 cm⁻¹ related to OH⁻ groups of the cellulose. It indicated that pretreatment promoted partial loss of this biomass portion, since the intensity of this signal is reduced by more than 50% in this wavelength (Ghali et al., 2012). The peaks in the 1200 cm⁻¹ region are related to the C–O–C bond of this homopolymer, whose absorbances are also lowered after pretreated samples (Mothé and De Miranda, 2009). This confirms the results showed in Section 3.2, which shows high glucose content in the liquid pretreatment fraction, and supports what was proposed by Yang et al. (2015), that another 80% of cellulose is amorphous or α -crystalline, that is, more easily removable. Carbonyl group (C=O) in the 1700 cm⁻¹ region is related to hemicellulose (Mothé and De Miranda, 2009). The absorbance value at this wavelength 0.06 for untreated and 0.02 for pretreated biomasses. This indicates partial removal of this biomass portion during this step. In addition to this region, hemicellulose is also identified through C–O–C bonds, which are represented at wavelength close to 1100 cm⁻¹ (Mothé and De Miranda, 2009). In this sector, untreated samples also present higher peaks than treated ones. This situation confirmed the results obtained with the determination of the carbohydrate contents in the liquid fraction of the pretreatment. The 1400 cm⁻¹ region is related to lignin (Xu et al., 2013), particularly the C–O bond of the syringing ring, present in its composition (Kim et al., 2003). The absorbances of biomasses that underwent pretreatment were reduced by 50% of that obtained for untreated ones.

3.3. Optimization of the enzymatic hydrolysis with high solid loading

Factorial planning analysis (Table 1) revealed that cellulose content was the most important variable. Among the possible combinations, the assay #6 as defined in the Table 4 was chosen as presenting the best enzymatic hydrolysis conditions, because it presents the balance between cellulose conversion and glucose concentration, making the use of cactus pear biomass, in these conditions, viable to ethanol production. It combined high cellulose conversion and released glucose concentration for both biomass varieties. Souza-Filho et al. (2016) evaluated the release of glucose content of 54.42 g L⁻¹ and 62.14 g L⁻¹ from enzymatic hydrolysate of acid-alkaline pretreated *Opuntia ficus-indica* and *Nopalea cochenillifera*, respectively. These values were always lower than those obtained with high solid loadings (20% w/v) of steam-exposed enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse and *Eucalyptus*

Table 4

Influence of cellulase, pectinase and biomass loading on RCCD, at glucose formation and cellulose conversion, during enzymatic hydrolysis of IPA-Sertânia and “Orelha de elefante mexicana” cactus pear varieties biomass.

Assays	Cellulase (FPU/g)	Pectinase (U/g)	Solids load (% w/v)	IPA-Sertânia		Orelha de elefante mexicana	
				Glucose (g/L ⁻¹)	Cc (%)	Glucose (g/L ⁻¹)	Cc (%)
1	5.00	0.40	20.00	54.55	75.21	51.11	60.99
2	5.00	0.40	30.00	59.27	48.43	65.26	49.16
3	5.00	0.59	20.00	49.16	65.83	46.04	52.97
4	5.00	0.59	30.00	61.69	51.25	59.82	43.44
5	10.00	0.40	20.00	53.87	74.03	55.29	67.59
6	10.00	0.40	30.00	69.39	60.19	76.15	60.63
7	10.00	0.59	20.00	54.34	74.85	56.24	69.10
8	10.00	0.59	30.00	66.90	57.30	66.70	50.68
9	3.17	0.47	25.00	50.39	49.48	51.08	45.18
10	11.83	0.47	25.00	62.06	65.75	71.37	70.83
11	7.50	0.35	25.00	59.13	61.67	65.38	63.27
12	7.50	0.71	25.00	63.01	67.08	63.50	60.88
13	7.50	0.47	16.60	46.94	79.20	41.50	56.67
14	7.50	0.47	33.40	61.50	45.86	62.13	38.39
15 (CP)	7.50	0.47	25.00	68.23	74.36	61.93	58.90
16 (CP)	7.50	0.47	25.00	67.76	73.70	64.78	62.50
17 (CP)	7.50	0.47	25.00	65.34	70.33	63.18	60.47

CP – Central point.

urograndis of 103 g L⁻¹ and 125 g L⁻¹, respectively (Chiarello et al., 2016). The lower glucose concentration in cactus pear hydrolysates must be due to the lower cellulose content in this type of biomass when compared to that traditional biomasses.

The Pareto's chart was used to determine the significant factors of the reaction system (at $\alpha = 0.05$). For both varieties, only cellulase and solid loadings were significant. Therefore, the modeling proposed general Eqs. (6) and (7) to “IPA-Sertânia” and “Orelha de elefante mexicana”, respectively, in which %Cc corresponds to the cellulose conversion to glucose response, C to cellulase factor, P to pectinase and S to the solid load:

$$\%Cc = 72.63 + 3.88C - 4.80C^2 + 0.03P - 2.41P^2 - 9.43S - 3.06S^2 + 0.56CP + 1.25CS + 1.06PS \quad (6)$$

$$\%Cc = 60.54 + 6.19C - 0.65C^2 - 1.92P + 0.79P^2 - 5.67S - 3.36S^2 + 0.66CP - 0.50CS - 1.15PS \quad (7)$$

After discharging the non-significant parameters of pectinase and variable interactions (Cellulase, Pectinase and Biomass), the following final Eqs. (8) and (9) were proposed for “IPA-Sertânia” and “Orelha de elefante mexicana” cultivars, respectively:

$$\%Cc = 72.63 + 3.88C - 4.80C^2 - 9.43S - 3.06S \quad (8)$$

$$\%Cc = 60.54 + 6.19C - 5.67S - 3.36S^2 \quad (9)$$

In addition, the relationship between the considered variables (Cellulase, Pectinase and Biomass) and the response (Cellulose Conversion) produced the surface response for “IPA-Sertânia” (Fig. 1A, C, E) and “Orelha de elefante mexicana” varieties (Fig. 1B, D, F) confirming that by decreasing solid loading and increasing cellulase loading shall contribute to increased cellulose conversion. These analyses were supported by the adequate determination coefficient ($R^2 = 0.95$). This means that only 5% of the total variance cannot be explained by the model. Gao et al. (2009) proposed that $R^2 \geq 0.90$ already represents significant correlation. The adjusted determination coefficient (R^2_{adj}) of 0.9 showed the agreement between observed and predicted correlation values. At last, the “F” Test confirmed that the models were indeed adjusted (Table 5), with non-significant lack of fit for “IPA-Sertânia” ($p = .45$) and “Orelha de elefante mexicana” ($p = .22$).

3.4. Optimization of enzymatic hydrolysis of cactus pear

Tests were carried out under the conditions of optimal planning points (assay #6) without enzyme addition and the results were compared to pectinase-added system (Table 6). Glucose content variation between the assays in the presence or absence of pectinase were 3.44% for the “IPA-Sertânia” and 4.6% for “Orelha de elefante mexicana”, which was not significant according paired *t*-test (“IPA-Sertânia” – $t = -1.24$, $p = .43$, “Orelha de elefante mexicana” – $t = 1.31$, $p = .26$). Pectinase, besides the hydrolytic role, was reported to decrease surface tension and viscosity of the medium (Zhang et al., 2013). However, these results showed that pectinase treatment is not important for this biomass. In our recent studies, we reported the release of 11.26 g glucose L⁻¹ after hydrolyzing thermally-pretreated the fresh biomass of the “Gigante” variety (*Opuntia ficus-indica*) with Polyfruit™ pectinase (Santos et al., 2016). However, in that work the biomass load was lower and the pectinase activity was higher than in the present work. In addition, Kuloyo et al. (2014) reported 45.5 g glucose L⁻¹ from sun-dried sulfuric acid pretreated *Opuntia* biomass hydrolysed with Pectinex Ultra SP-L™, Celluclast™ 1.5L and Novozyme 188™ (β -glucosidase).

The enzymatic hydrolysis of both varieties was followed during 48 h (Fig. 2). Glucose and xylose were already present in the beginning of the hydrolysis due to the process of biomass drying. Glucose concentration reached 47 g L⁻¹ and 50 g L⁻¹, for “IPA-Sertânia” e “Orelha de elefante mexicana”, respectively, after the first six hours of hydrolysis, followed by slow increase to 67.72 g L⁻¹ and 74.45 g L⁻¹ for the remaining of the treatment. A recent study evaluated the enzymatic hydrolysis, with 25 FPU g⁻¹, at 150 rpm and 50 °C, for 72 h, of cladodes (*Opuntia ficus-indica*) pretreated in alkaline medium. At the end of this step, 32.47 g L⁻¹ of total reducing sugars were obtained, with 84.5% cellulose conversion (Udeh and Erkurt, 2017).

3.5. Fermentation of cactus pear enzymatic hydrolyzate

Fermentation were performed to evaluate the potential of this biomass to be converted to ethanol (Fig. 3). After eight hours, the following results were achieved with 30% w/v biomass load: ethanol production of 26.4 g L⁻¹, fermentation efficiency (Ef) of 76.3%, volumetric productivity (Qp) of 3.3 g L⁻¹ h⁻¹ and ethanol yield (Yp/s) of 0.39 g g⁻¹ for “IPA-Sertânia” and 34.9 g L⁻¹, 82.8%, 4.5 g L⁻¹ h⁻¹ and 0.42 g g⁻¹ for “Orelha de elefante mexicana”. Recent report on the 16 h

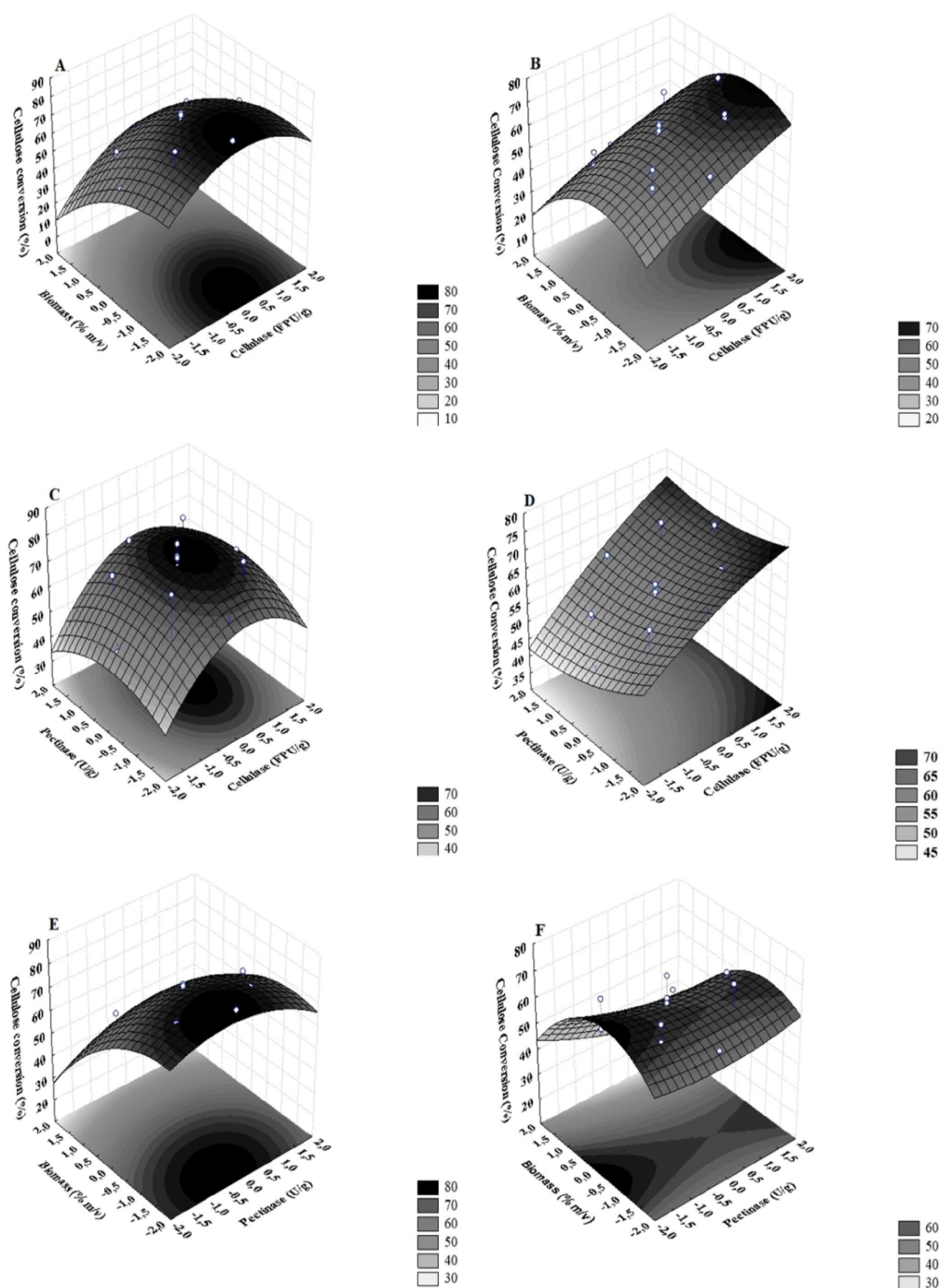


Fig. 1. Response surfaces, generated from the interaction of significant factors for the proposed Rotational Central Compound Design (RCCD), of the cactus species *Nopalea cochenillifera*, “IPA-Sertânia” variety and *Opuntia ficus-indica*, “Orelha de elefante mexicana” variety. A, C, E: IPA-Sertânia; B, D, F: Orelha de elefante mexicana.

fermentation assays of enzyme-treated *Opuntia ficus-indica* showed the final results of $E_f = 88\%$, $Q_p = 0.9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $Y_p/s = 0.46 \text{ g g}^{-1}$ from 10% w/v (Udeh and Erkurt, 2017). Additionally, 48 h fermentation of enzyme-treated *Nopalea cochenillifera* biomass resulted in ethanol with $E_f (\%) = 95.6\%$ and $Y_p/s = 0.49 \text{ g g}^{-1}$ with 10% w/v of biomass load (Souza-Filho et al., 2016). Three important aspects must

be taken in consideration. First, those reports used lower biomass load than used in the present work, which represent less osmotic pressure and rheological problems in system. Second, the period of fermentation were two and six times higher than in the present study, resulting in lower productivity. And lastly, the present work did not use supplementation of the fermentation substrate, while these reports

Table 5
Analysis of variance, for the RCCD, to IPA-Sertânia and “Orelha de elefante mexicana” cactus pear varieties biomass.

Cultivars	Parameters	Quadratic sum	Degrees of freedom	Quadratic mean
IPA-Sertânia	Regression	1742.33	9	193.59
	Residue	96.97	7	13.85
	Lack of fit	87.61	5	17.52
	Pure error	9.36	2	4.68
	Total	1839.30	16	
Orelha de elefante Mexicana	Regression	1296.96	9	216.16
	Residue	69.55	7	9.94
	Lack of fit	63.02	5	12.60
	Pure error	6.53	2	3.27
	Total	1366.51	16	

Table 6
Influence of pectinase on enzymatic hydrolysis, carried out according to assay 6, to IPA-Sertânia and “Orelha de elefante mexicana” cactus pear varieties biomass.

Varieties	Compounds	Without pectinase		With pectinase	
		C (g/L ⁻¹)	%C	C (g/L ⁻¹)	%C
IPA-Sertânia	Glucose	67.72 ± 0.46	58.25	70.05 ± 2.75	60.96
	Xylose	22.00 ± 1.55	0.00	22.60 ± 0.70	0.00
	Galacturonic acid	2.49 ± 0.12	0.00	2.57 ± 0.06	0.00
	Formic acid	ND	ND	1.91 ± 0.13	1.68
Orelha de elefante mexicana	Glucose	72.41 ± 2.98	56.69	75.74 ± 3.38	60.21
	Xylose	22.29 ± 0.76	0.00	23.89 ± 3.38	2.17
	Galacturonic acid	2.38 ± 0.04	0.94	2.49 ± 0.10	1.34
	Formic acid	ND	ND	2.42 ± 0.05	1.98

C (g/L⁻¹) – Compound concentration; %C – Conversion percentage; ND – Not determined.

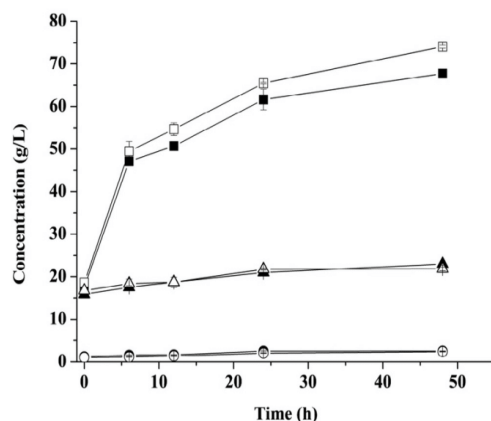


Fig. 2. Carbohydrates and organic acids formation, for the cactus species *Nopalea cochenillifera*, “IPA-Sertânia” variety (A) and *Opuntia ficus-indica*, “Orelha de elefante mexicana” variety biomass, without Pectinase. Square, triangle and circle correspond to glucose (g/L⁻¹), xylose (g/L⁻¹) and galacturonic acid (g/L⁻¹), respectively. Full symbols: IPA-Sertânia; Empty symbols: Orelha de elefante mexicana.

supplemented the hydrolysates with (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O and yeast extract. It imposes higher fermentation cost to the system.

The average yield of the cactus pear crop in northeastern Brazil is approximately 85 ton ha⁻¹ year⁻¹ (Santos et al., 2016), being able to reach values of 500 ton ha⁻¹ year⁻¹ in the densified system and under optimal growing conditions in Chile (Nobel et al., 1992). Considering the values reported in literature, as well as the glucose, cellulose conversion and fermentative parameters, obtained in the present work, we obtained about 2,007–11,235 L ha⁻¹ year⁻¹ for variety “IPA-Sertânia”,

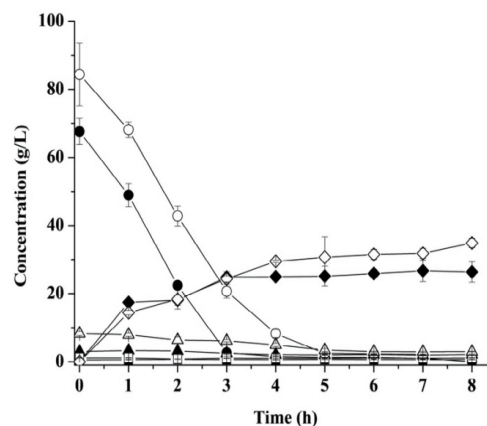


Fig. 3. Ethanol production from the enzymatic hydrolysates of *Nopalea cochenillifera*, “IPA-Sertânia” variety (A) and *Opuntia ficus-indica*, “Orelha de elefante mexicana” variety, by *Saccharomyces cerevisiae* (JP1). Square, circle, triangle and diamond correspond to galacturonic acid (g/L⁻¹), glucose (g/L⁻¹), xylose (g/L⁻¹) and ethanol (g/L⁻¹), respectively. Full symbols: IPA-Sertânia; Empty symbols: Orelha de elefante mexicana.

and 2,072–13,446 L ha⁻¹ year⁻¹ for “Orelha de elefante mexicana”, to 85 ton ha⁻¹ year⁻¹ and 500 ton ha⁻¹ year⁻¹, respectively.

4. Conclusions

Our results showed that the optimum conditions for the enzymatic hydrolysis of two cactus pear varieties resistant to carmine cochineal were cellulase load of 10 FPU/g and 30% w/v of solid loading, in the absence of chemical pretreatment and pectinase, with average enzymatic hydrolysis efficiency of 60% and good fermentability of hydrolysates. In this context, cactus pear is a good alternative for the biofuels production, with low production costs in areas of low water availability.

Acknowledgments

The authors acknowledge the researchers Dr. Irapuan Pinheiro and Dr. Rafael Souza, from Universidade de Pernambuco, for making available the liquid chromatograph; CAPES for student scholarships and CNPq for financial support (edital 14/2014, processo 4544232014-2) to this research.

References

- Alencar, B.R.A., Reis, A.L.S., de Souza, R.D.F.R., Morais, M.A., Menezes, R.S.C., Dutra, E.D., 2017a. Recycling the liquid fraction of alkaline hydrogen peroxide in the pretreatment of corn stover. *Bioresour. Technol.* 241, 928–935.
- Alencar, B.R.A., Rocha, J.M.T.S., Rocha, G.J.M., Gouveia, E.R., 2017b. Effect of tween-80 addition in dilute acid pretreatment of waste office paper on enzymatic hydrolysis for bioethanol production by SHF and SSF processes. *Cellul. Chem. Technol.* 51, 121–126.
- Bensadón, S., Hervert-Hernández, D., Sáyo-Ayerdi, S.G., Goñi, I., 2010. By-products of *Opuntia ficus-indica* as a source of antioxidant dietary fiber. *Plant Foods Hum. Nutr.* 65, 210–216.
- Bp global, Statistical review of world energy. BP Global. Available in: < <https://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/energy-economics/statistical-review-2016/bp-statistical-review-of-world-energy-2016-full-report.pdf> >, 2016 (accessed May 9, 2017).
- Calari, I.P., Barbosa, M.H., Ferreira, S.O., Teófilo, R.F., 2017. Estimation of cellulose crystallinity of sugarcane biomass using near infrared spectroscopy and multivariate analysis methods. *Carbohydr. Polym.* 158, 20–28.
- Cao, S., Aita, G.M., 2013. Enzymatic hydrolysis and ethanol yields of combined surfactant and dilute ammonia treated sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 131, 357–364.
- Chandel, A.K., Antunes, F.A., Anjos, V., Bell, M.J., Rodrigues, L.N., Polikarpov, I., Azevedo, E.R., Bernardinelli, O.D., Rosa, C.A., Pagnocca, F.C., Silva, S.S., 2014. Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid-base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* 7, 63.
- Chandra, R.P., Bura, R., Mabee, W.E., Berlin, D.A., Pan, X., Saddler, J.N., 2007. Substrate

- pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Biofuels* 108, 67–93.
- Cheng, K.K., Zhang, J.A., Ping, W.X., Ge, J.P., Zhou, Y.J., Ling, H.Z., Xu, J.M., 2008. Sugarcane bagasse mild alkaline/oxidative pretreatment for ethanol production by alkaline recycle process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151, 43–50.
- Chiarello, L.M., Ramos, C.E.A., Neves, P.V., Ramos, L.P., 2016. Production of cellulosic ethanol from steam-exploded *Eucalyptus urograndis* and sugarcane bagasse at high total solids and low enzyme loadings. *Sustainable Chem. Processes* 4, 15.
- Cushman, J.C., Davis, S.C., Yang, X., Borland, A.M., 2015. Development and use of bioenergy feedstocks for semi-arid and arid lands. *J. Exp. Bot.* 66, 4177–4193.
- Davis, S.C., Kuzmick, E.R., Niechayev, N., Hunsaker, D.J., 2017. Productivity and water use efficiency of *Agave americana* in the first field trial as bioenergy feedstock on arid lands. *Gcb Bioenergy* 9, 314–325.
- Eriksson, T., Björjesson, J., Tjerneld, F., 2002. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 53–364.
- Gao, H., Liu, M., Liu, J., Dai, H., Zhou, X., Liu, X., Zhuo, Y., Zhang, W., Zhang, L., 2009. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14–12A using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 100, 4012–4016.
- Gaurav, N., Sivasankari, S., Kiran, G.S., Ninawe, A., Selvin, J., 2017. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: a review. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 73, 205–214.
- Ghali, S.N., El-Faramawy, H.S., Eissa, M.M., 2012. Influence of boron additions on mechanical properties of carbon steel. *J. Miner. Mater. Charact. Eng.* 11, 995.
- Ghosh, P., Ghose, T.K., Scheper, T., 2003. Biotechnology in India II. in advances in biochemical engineering/biotechnology. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 85, 1.
- Gosling, S.N., Arnell, N.W., 2016. A global assessment of the impact of climate change on water scarcity. *Clim. Change* 134, 371–385.
- Gouveia, E.R., Nascimento, R.D., Souto-Maior, A.M., Rocha, G.D.M., 2009. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Quim. Nova* 32, 1500–1503.
- Gupta, A., Verma, J.P., 2015. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 41, 550–567.
- Humbird, D., Davis, R., Tao, L., Kinchin, C., Hsu, D., Aden, A., Schoen, P., Lukas, J., Olthof, B., Worley, M., Sexton, D., Dudgeon, D., 2011. Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover (No. NREL/TP-5100-47764). National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, CO.
- ICARDA-FAO – ICARDA/ Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. Crop ecology. Cultivation and Uses of Cactus Pear. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Rome.
- Kim, T.H., Kim, J.S., Sunwoo, C., Lee, Y.Y., 2003. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresour. Technol.* 90, 39–47.
- Kuloyo, O.O., Du Preez, J.C., del Prado García-Aparicio, M., Kilian, S.G., Steyn, L., Görgens, J., 2014. *Opuntia ficus-indica* cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 3173–3183.
- Li, J., Li, S., Fan, C., Yan, Z., 2012. The mechanism of poly (ethylene glycol) 4000 effect on enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Colloid Surf. B Biointerfaces* 89, 203–210.
- Li, Y., Qi, B., Luo, J., Wan, Y., 2015. Alkali recycling from rice straw hydrolyzate by ultrafiltration: fouling mechanism and pretreatment efficiency. *Ind. Eng. Chem. Res.* 54, 7925–7932.
- Malainine, M.E., Dufresne, A., Dupeyre, D., Mahrouz, M., Vuong, M.R., 2003. Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus-indica* Cellulose extraction and characterisation. *Carbohydr. Polym.* 51, 77–83.
- Menegol, D., Scholl, A.L., Fontana, R.C., Dillon, A.J.P., Camassola, M., 2014. Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. *Energy Convers. Manage.* 88, 1252–1256.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96, 673–686.
- Mothé, C.G., De Miranda, I.C., 2009. Characterization of sugarcane and coconut fibers by thermal analysis and FTIR. *J. Therm. Anal. Calorim.* 97, 661.
- Nobel, P.S., García-Moya, E., Quero, E., 1992. High annual productivity of certain agaves and cacti under cultivation. *Plant Cell Environ.* 15, 329–335.
- Qi, B., Chen, X., Su, Y., Wan, Y., 2011. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Bioresour. Technol.* 102, 2881–2889.
- Rocha, G.J.M., Nascimento, V.M., da Silva, V.F.N., Corso, D.L.S., Gonçalves, A.R., 2014. Contributing to the environmental sustainability of the second generation ethanol production: delignification of sugarcane bagasse with sodium hydroxide recycling. *Ind. Crops Prod.* 59, 63–68.
- Santos, T.N., Dutra, E.D., do Prado, A.G., Leite, F.C.B., de Souza, R.D.F.R., dos Santos, D.C., Abreu, C.A.M., Simões, D.A., Morais Jr., M.A., Menezes, R.S.C., 2016. Potential for biofuels from the biomass of prickly pear cladodes: challenges for bioethanol and biogas production in dry areas. *Biomass Bioenergy* 85, 215–222.
- Silva, L.M., Lara Fagundes, J., Almeida Viegas, P.A., Neves Muniz, E., de Albuquerque Rangel, J.H., Moreira, A.L., Acosta, A.B., 2014. Produtividade da palma forrageira cultivada em diferentes densidades de plantio. *Ciência Rural* 44.
- Souza-Filho, P.F., Ribeiro, V.T., dos Santos, E.S., Macedo, G.R., 2016. Simultaneous saccharification and fermentation of cactus pear biomass—evaluation of using different pretreatments. *Ind. Crops Prod.* 89, 425–433.
- Udeh, B.A., Erkert, E.A., 2017. Compositional and structural changes in *Phoenix canariensis* and *Opuntia ficus-indica* with pretreatment: effects on enzymatic hydrolysis and second generation ethanol production. *Bioresour. Technol.* 224, 702–707.
- UNESCO, Urgent need to manage water more sustainably, says UN report. *Unesco office in Brasilia*. Available in: < http://www.unesco.org/new/en/brasilia/about-this-office/single-view/news/urgent_need_to_manage_water_more_sustainably_says_un_report/ > , 2015 (accessed Mar 14, 2017).
- Vandenbrink, J.P., Hiltner, R.N., Das, K.C., Paterson, A.H., Feltus, F.A., 2012. Analysis of crystallinity index and hydrolysis rates in the bioenergy crop *Sorghum bicolor*. *BioEnergy Res.* 5, 387–397.
- Xu, F., Yu, J., Tesso, T., Dowell, F., Wang, D., 2013. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: a mini-review. *Appl. Energy* 104, 801–809.
- Yang, L., Lu, M., Carl, S., Mayer, J.A., Cushman, J.C., Tian, E., Lin, H., 2015. Biomass characterization of *Agave* and *Opuntia* as potential biofuel feedstocks. *Biomass Bioenergy* 76, 43–53.
- Yu, X., Liu, Y., Meng, J., Cheng, Q., Zhang, Z., Cui, Y., Liu, J., Teng, L., Lu, J., Meng, Q., Ren, X., 2015. Optimization of enzyme complexes for efficient hydrolysis of corn stover to produce glucose. *Pak. J. Pharm. Sci.* 28.
- Zhang, J., Pakarinen, A., Viikari, L., 2013. Synergy between cellulases and pectinases in the hydrolysis of hemp. *Bioresour. Technol.* 129, 302–307.
- Zhang, H., Ye, G., Wei, Y., Li, X., Zhang, A., Xie, J., 2017. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse with ferric chloride pretreatment and surfactant. *Bioresour. Technol.* 229, 96–103.