

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR**

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE**

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares

**PRODUÇÃO POTENCIAL DE ETANOL DE VARIEDADES DE
CANA-DE-AÇÚCAR SOB ADUBAÇÃO NITROGENADA**

JOSÉ RIBEIRO DA SILVA JUNIOR

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Simões Cezar Menezes

Co-orientador: Dr. Eric Xavier de Carvalho

Recife, PE

Abril, 2017

JOSÉ RIBEIRO DA SILVA JUNIOR

**PRODUÇÃO POTENCIAL DE ETANOL DE VARIEDADES DE
CANA-DE-AÇÚCAR SOB ADUBAÇÃO NITROGENADA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Fontes renováveis de energia.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Simões Cezar Menezes

Co-orientador: Dr. Eric Xavier de Carvalho

Recife, PE

Abril, 2017

S586p Silva Junior, José Ribeiro da.

Produção potencial de etanol de variedades de cana-de-açúcar sob adubação nitrogenada. / José Ribeiro da Silva Junior. - Recife: O Autor, 2017.

76 f. : il., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Simões Cezar Menezes.

Coorientador: Prof. Dr. Eric Xavier de Carvalho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2017.

Inclui referências bibliográficas.

1. Fontes renováveis. 2. Etanol. 3. Biomassa lignocelulósica. I. Menezes, Rômulo Simões Cezar, orientador. II. Carvalho, Eric Xavier de, coorientador. III. Título.

CDD 662.88 (21. ed.)

UFPE

BDEN/2017-15

FOLHA DE APROVAÇÃO

PRODUÇÃO POTENCIAL DE ETANOL DE VARIEDADES DE CANA- DE-AÇÚCAR SOB ADUBAÇÃO NITROGENADA

Dissertação aprovada em: 11/04/2017

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Simões Cezar Menezes

Co-orientador: Dr. Eric Xavier de Carvalho

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Everardo Valadares de Sá Barretto Sampaio (DEN-UFPE)

Prof. Dr. Renato Lemos dos Santos (IFPE)

Dr. Alexandre Libânio Silva Reis (CETENE)

Orientador

Coordenação PROTEN/UFPE

*“Não há nada como o sonho para criar o futuro. Utopia hoje,
carne e osso amanhã.”*

Victor-Marie Hugo

Aos meus irmão e sobrinho, Djair e Arthur que foram cedo para a casa do Pai e que, de lá zelam e intercedem por nossa família,

dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que em sua infinita misericórdia concedeu inteligência aos homens, possibilitando-os estudar suas magníficas obras.

Aos meus pais pelo amor incondicional, por sempre acreditarem no meu trabalho e empenharem forças para tornar possível todo o meu percurso acadêmico.

A Maria Sophia, minha namorada, que foi também uma excelente estagiária voluntária, principalmente nos momentos de pesagem do material vegetal.

Ao meu orientador Professor Dr. Rômulo Simões. Cezar. Menezes, pela cordialidade e ensinamentos transmitidos.

Ao meu co-orientador Dr. Eric Xavier. de Carvalho, pelos conselhos, sugestões e pronta disponibilidade em ajudar.

Aos amigos Esmael Oliveira, Ítalo Costa, Rhyanne Costa, Lídia Leite, João Paulo Silva, João Paulo Siqueira, Rafael Rodrigues, Rafael Bendito, Renata Carvalho Isabelle Lacerda, Leandro Reis, Uemeson Santos e Bárbara Alencar, por contribuições diretas e indiretas no desenvolvimento deste trabalho, ou apenas pela árdua tarefa de me aguentarem como amigo.

Aos professores Everardo Sampaio, Emmanuel Dutra e Alexandre Libânio Reis, pelos conhecimentos transmitidos.

Às empresas Instituto Agrônomo de Pernambuco, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Usina Olho D'Água S/A e LNF Latino América S/A, pela disponibilização de material e instalações para desenvolvimento desta dissertação.

E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos.

PRODUÇÃO POTENCIAL DE ETANOL DE VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB ADUBAÇÃO NITROGENADA

Autor: José Ribeiro da Silva Junior

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Simões Cezar Menezes

Co-orientador: Dr. Eric Xavier de Carvalho

RESUMO

A busca da sociedade por fontes alternativas de energia faz com que cada vez mais as instituições de pesquisa busquem formas eficazes de atender a esta demanda crescente. Os biocombustíveis mostram-se como os principais atenuadores dos impactos causados pela queima dos combustíveis fósseis. Com alta capacidade de produção de cana-de-açúcar, o Brasil é hoje o principal produtor mundial de cana. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial de produção de etanol de primeira e de segunda geração em dois ciclos de cultivo de variedades de cana-de-açúcar em Pernambuco. De forma específica objetivou-se avaliar o efeito da adubação nitrogenada sobre a produtividade e variáveis agroindustriais da cultura, caracterizar quimicamente a biomassa lignocelulósica em diferentes partes da planta, estimar o potencial de produção de etanol de primeira e segunda geração e verificar a eficiência de ensaios de deslignificação e hidrólise enzimática. Um experimento em campo foi conduzido na estação experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) em Itambé, PE, desde 2012, com delineamento experimental em blocos casualizados em arranjo fatorial, representados por cinco variedades de cana-de-açúcar (RB863129, RB92579, RB867515, RB931011 e RB962962) e três níveis de adubação nitrogenada (testemunha, 40 e 80 kg.ha⁻¹ de N na forma de ureia), com 4 blocos. As parcelas foram compostas por sete fileiras com 14 metros de comprimento e 1 m entre fileiras (98m²). Foram utilizados os dados referentes aos ciclos de 2014 e 2015 (1^a e 2^a socas). Na colheita, a biomassa das plantas foi separada em colmo, folhas e ponteiro e subamostras foram coletadas para caracterização química quanto aos componentes da parede celular. Foi medida a produtividade para cada uma das variedades e feitas análises tecnológicas (°brix, fibra, pol do caldo extraído e açúcar total recuperável). A produção de etanol de primeira geração, foi estimada em 7739 a 12312 L.ha⁻¹ para as variedades RB962962 e RB867515, respectivamente. A variedade RB962962 apresentou melhores resultados (10446,99 L.ha⁻¹) de produtividade de etanol de segunda geração. Em função de seu desempenho na etapa anterior foram realizados ensaios de deslignificação do bagaço da variedade RB962962 com H₂O₂ alcalino, verificando-se perda de massa de 40,4% (±1,88; n=5), e após este processo de pré-tratamento uma redução de 23,6% nos teores de lignina detergente ácido (LDA) e incremento de 47,95% nos teores de celulose. Verificaram-se as maiores eficiências de hidrólise de 34,84% e 35,12% independentemente da carga enzimática (5 FPU.g⁻¹) para as cargas de sólidos de 5 e 10 % (m/v), respectivamente.

Palavras-chave: Fontes renováveis. Etanol. Biomassa lignocelulósica.

POTENTIAL PRODUCTION OF ETHANOL FROM SUGARCANE VARIETIES UNDER NITROGEN FERTILIZATION

Author: José Ribeiro da Silva Junior

Advisor: Professor Rômulo Simões Cezar Menezes, Ph.D.

Co-advisor: Dr. Eric Xavier de Carvalho

ABSTRACT

Society's search for alternative energy sources promotes research institutions to seek for effective ways to meet this growing demand. Biofuels are the main mitigators of the impacts caused by the burning of fossil fuels. With high production capacity of sugarcane, Brazil is now the world's leading producer of sugarcane. The general objective of this work was to evaluate the potential of first and second generation ethanol production in two crop cycles for sugarcane varieties in Pernambuco state. Specifically aimed to evaluate the effect of nitrogen fertilization (control, 40 and 80 kg.(hm²)⁻¹ of N) on the productivity and agroindustrial variables of the crop, to chemically characterize the lignocellulosic biomass in different parts of the plant, to estimate the potential production of the first and second generation ethanol and to verify the efficiency of the delignification and enzymatic hydrolysis tests studied. The field experiment was conducted at the experimental station of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA) in Itambé, PE, since 2012, with a randomized block design in a factorial arrangement, represented by five varieties of sugarcane (RB863129, RB92579, RB867515, RB931011 e RB962962) and three levels of nitrogen fertilization (control, 40 and 80 kg.(hm²)⁻¹ of N in the form of urea) with 4 blocks. The plots were composed of seven rows with 14 meters in length and 1 m between rows (98m²). It was using in this work the data referring to the cycles of the years 2014 and 2015 (2nd and 3rd crops). At harvest, the biomass of the plants was separated into stem, leaves (dried and greens) and subsamples were collected for chemical characterization of the components of the cell wall. The productivity for each one of the varieties in each fertilization was verified and was made the technological analysis of the sugarcane cultivars (°brix, fiber, sucrose in the extracted broth and total recovered sugar). From these data it was possible to estimate the production of first-generation ethanol, with values varying from 7738.70 to 12311.76 L.(hm²)⁻¹ for the varieties RB962962 and RB867515, respectively. The variety RB962962 presented better results (10446.99 L.(hm²)⁻¹) of second generation ethanol productivity. Due to its performance in the previous stage it was made the trials of delignification of bagasse of variety RB962962 with alkaline H₂O₂, where was observed weight loss of 40.4% (±1,88; n=5), and a reduction of 23.62% in acid detergent lignin (ADL) and a 47.95% increase in cellulose contents were observed after this pretreatment process. The highest hydrolysis efficiencies of 34.84% and 35.12%, independently of the enzymatic charge (5 FPU.g⁻¹), were found for solid loads of 5 and 10% (w/v), respectively.

Keywords: Renewable sources. Ethanol. Lignocellulosic biomass.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Composição da cana-de-açúcar.....	21
Figura 2	Produção agrícola média das cultivares em Planossolo mesotrófico textura arenosa/média (PL) e Podzólico Vermelho Amarelo mesotrófico textura arenosa/média (PV).....	22
Figura 3	(a) Produção total de cana-de-açúcar e destinação à produção de açúcar e etanol, (b) produção de cana total destinada à produção de etanol e à produção de etanol anidro e hidratado, (c) produção total de etanol, etanol anidro e hidratado, a nível nacional.....	25
Figura 4	Fluxograma da produção de etanol.....	27
Figura 5	Regiões específicas da celulose. Fonte: Rabelo, 2007.....	34
Figura 6	Precipitação no período experimental (2014 e 2015) e média de 25 anos, na estação experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco em Itambé – PE.....	35
Figura 7	Composição lignocelulósica do bagaço da variedade de cana-de-açúcar RB962962, antes e depois do pré-tratamento com H ₂ O ₂ alcalino.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeitos de diferentes pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos.....	32
Tabela 2	Análises químicas do solo do campo experimental em profundidade coletado antes da calagem e adubação do experimento com cana-de-açúcar, no ano de 2012, na estação experimental do Instituto Agrônômico de Pernambuco em Itambé – PE.....	35
Tabela 3	Condições experimentais para a hidrólise enzimática.....	42
Tabela 4	Produtividade de cinco variedades de cana-de-açúcar, em três níveis de adubação nitrogenada, nas duas primeiras socarias (2014 e 2015), em experimento de campo, em Itambé, PE.....	44
Tabela 5	Resumo da análise de variância (Teste F e significância) para as variáveis Brix, fibra, PCE e ATR, em arranjo fatorial entre as variedades e adubações para dois ciclos de cultivo em Itambé-PE.....	46
Tabela 6	Variáveis agroindustriais (Brix, fibra, PCE e ATR) para cinco variedades de cana-de-açúcar e três níveis de adubação nitrogenada nas duas primeiras socarias (2014 e 2015) em experimento de campo, em Itambé.....	47
Tabela 6 (Continuação)	Variáveis agroindustriais (Brix, fibra, PCE e ATR) para cinco variedades de cana-de-açúcar e três níveis de adubação nitrogenada nas duas primeiras socarias (2014 e 2015) em experimento de campo, em Itambé.....	48
Tabela 7	Teores (%) de celulose, hemicelulose e LDA no bagaço de variedades de cana-de-açúcar cultivadas com (N40) e sem (N0) adubação nitrogenada em cana-soca.....	52

Tabela 8	Produtividade de etanol de primeira geração nas duas primeiras socarias (2014 e 2015) de cinco variedades de cana-de-açúcar, com três níveis de adubação nitrogenada, em experimento de campo, em Itambé.....	54
Tabela 9	Produtividade de etanol de segunda geração a partir do bagaço de variedades de cana-de-açúcar com (N40) e sem (N0) adubação nitrogenada na cana-soca.....	55
Tabela 10	Condições experimentais para a hidrólise enzimática, teores de açúcares totais (AT), glicose e eficiência de hidrólise (EH) para bagaço da variedade de cana-de-açúcar RB962962 pré-tratado com H ₂ O ₂ alcalino.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: Graus Celsius

°GL: Graus Gay Lussac

AR: Açúcares redutores

ART: Açúcares redutores totais

ATR: Açúcares totais recuperáveis

CIB: Conselho de Informações sobre Biotecnologia

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CONAB: Companhia Nacional do Abastecimento

CONSECANA: Conselho dos Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo

FBN: Fixação biológica de Nitrogênio

g: grama

GEE: Gases do efeito estufa

h: hora

ha: hectare

INPM: Instituto Nacional de Pesos e Medidas

IPA: Instituto Agrônomo de Pernambuco

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada

L: litro

LDA: Lignina detergente ácido

min: minuto

mL: mililitro

pH: Potencial hidrogeniônico

Proálcool: Programa Nacional do Álcool

TCH: Tonelada de colmos por hectare

USA: Estados Unidos da América

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 PANORAMA DA PRODUÇÃO CANAVIEIRA NO BRASIL E EM PERNAMBUCO	19
2.2 NITROGÊNIO NO CULTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR	20
2.3 MANEJO DA PALHADA NO CULTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	21
2.4 VARIÁVEIS AGROINDUSTRIAIS DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO BIOENERGÉTICA	22
2.5 PRODUÇÃO DE ETANOL NO BRASIL.....	24
2.6 OBTENÇÃO DE ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO A PARTIR DO CALDO DA CANA-DE-AÇÚCAR	27
2.7 OBTENÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DA CANA-DE-AÇÚCAR	28
2.6.1 Composição lignocelulósica.....	29
2.6.2 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	31
2.6.3 Hidrólise de materiais lignocelulósicos.....	34
2.6.3.1. Enzimas celulases.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 DESCRIÇÃO DO EXPERIMENTO EM CAMPO	36
3.2 VARIÁVEIS AGROINDUSTRIAIS	38
3.3 CARACTERIZAÇÃO LIGNOCELULÓSICA DA BIOMASSA.....	39
3.4 ESTIMATIVAS DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO.....	39
3.5 EFICIÊNCIA DOS PROCESSOS PARA ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO	40
3.5.1 Pré-tratamento	40
3.5.2 Preparo da curva padrão de glicose	41
3.5.3 Quantificação dos açúcares redutores pelo método DNS.....	41
3.5.4 Determinação da atividade enzimática	42
3.5.5 Hidrólise enzimática.....	43
3.5.6 Quantificação dos açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência	44

3.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	PRODUTIVIDADE DE CANA-DE-AÇÚCAR	46
4.2	VARIÁVEIS AGROINDUSTRIAIS	47
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	53
4.4	ESTIMATIVAS DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO	55
4.5	EFICIÊNCIA DOS PROCESSOS PARA ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO	58
4.5.1	Pré-tratamento	58
4.5.2	Atividade enzimática	59
4.5.3	Hidrólise enzimática	59
5.	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a emissão de gases do efeito estufa (GEE), vem tornando a sociedade alerta para a utilização de formas alternativas de energia que possam reduzir seus impactos. O uso de biocombustíveis, como o etanol, representa uma das formas mais efetivas de reduzir as emissões de GEE associadas ao consumo energético no setor de transporte (MACEDO, 2006).

Já utilizado em larga escala no Brasil, o etanol mostra-se como um forte atenuante dos impactos ambientais causados pelos GEE, provenientes da queima de combustíveis de origem fóssil. Dados apontam que seu consumo reduz em 70% a emissão de CO₂ na atmosfera em relação à gasolina (SEABRA, 2008). A produção e o uso do etanol no Brasil são hoje o melhor exemplo da introdução de energia renovável com uma grande escala de produção, partindo-se da produção estabelecida de açúcar.

Por sua alta capacidade de produção de cana-de-açúcar, o Brasil é hoje o principal produtor mundial de etanol de cana. Pernambuco é o sétimo maior produtor de cana-de-açúcar do país, uma produção que representa 2,9% do total nacional, tendo na última safra (2014/2015) plantado 284,6 mil ha, com uma produtividade média de 50,6 Mg. ha⁻¹ (CONAB, 2016).

O melhoramento genético tem proporcionado a obtenção de novas variedades, que serão responsáveis por atender as mais diversas áreas de produção no território nacional. Técnicas agronômicas (preparo, adubação do solo, entre outras) que proporcionem o manejo adequado do ecossistema canavieiro têm dado suporte para que as variedades expressem o seu máximo em produtividade de cana e seus derivados.

Estima-se que a palha, mantida sobre o solo após a colheita mecanizada, representa aproximadamente 1/3 do potencial energético da cana-de-açúcar e na medida em que as tecnologias para a sua utilização em cogeração e produção de etanol de segunda geração estejam maduras, será necessário ter uma fundamentação bastante clara dos benefícios da palha no campo que permita decidir sobre a relação palha no solo/palha removida de forma a melhor contribuir com a sustentabilidade do sistema canavieiro (CARVALHO, 2012).

O bagaço da cana-de-açúcar é em sua grande maioria, quando para obtenção de energia, queimado em caldeiras para geração de calor e geração de eletricidade. O aproveitamento de seus componentes estruturais (celulose e hemicelulose) possibilitará a obtenção de maiores volumes de etanol, produzindo-se o etanol celulósico (etanol de segunda

geração), quando somados a produção já convencionalmente obtida de etanol proveniente do caldo (etanol de primeira geração).

Um dos principais gargalos que envolvem a produção de etanol celulósico é desconstruir a parede celular liberando os polissacarídeos como fonte de açúcares fermentescíveis de forma eficiente e economicamente viável. Com a possibilidade de dobrar o potencial energético da cana de cana-de-açúcar, a utilização do material lignocelulósico remanescente da colheita e moagem para obtenção de etanol enfrentam alguns entraves de natureza técnica e econômica (SANTOS et al., 2012).

Para disponibilização dos açúcares presentes na palhada e no bagaço, antes da fermentação deste material, é necessária a utilização de técnicas de pré-tratamento e hidrólise (enzimática ou ácida), que oneram a produção. Em geral, os materiais lignocelulósicos são resistentes a bioconversão e requerem um pré-tratamento para aumentar sua digestibilidade e tornar os materiais presentes em sua estrutura, que são passíveis de serem convertidos em açúcares fermentescíveis, mais acessíveis à ação das enzimas no processo subsequente de hidrólise enzimática.

O pré-tratamento é visto como uma das etapas do processo mais caras na conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis e por isso, esta etapa apresenta um grande potencial para melhorar a eficiência e baixar o custo no processo de pesquisa e desenvolvimento. (RABELO, 2007).

Dentre as diversas técnicas utilizadas para o pré-tratamento, o uso do peróxido de hidrogênio alcalino (H_2O_2) tem despertado grande interesse (ARAÚJO, 2016), pois apresenta uma boa recuperação de polissacarídeos na forma de monossacarídeos fermentescíveis após o processo de hidrólise. Sabe-se também que o H_2O_2 praticamente não forma produtos secundários que venham a inibir os processos subsequentes, apresentando ainda baixa toxicidade e impacto ambiental (BANERJEE et al., 2012).

A hidrólise enzimática, que ocorre após o pré-tratamento, aumenta a acessibilidade ao ataque enzimático (RABELO, 2007). Nesta etapa, celulose e hemicelulose são convertidas em açúcares fermentescíveis por meio de enzimas capazes de degradar o complexo celulósico. Devido a condições mais suaves aplicadas durante o processo, uma menor quantidade de subprodutos é liberada, resultando em um alto rendimento de açúcares fermentescíveis, quando comparada a hidrólises de natureza ácida (SZCZODRAK E FIEDUREK, 1996; WYMAN, 1999; RILEY, 2002; LEATHERS, 2003). Apesar do alto custo das enzimas, que, na atualidade, torna o processo inviável do ponto de vista econômico, espera-se uma redução

dos custos a longo prazo, em função da possibilidade de obtenção de rendimentos muito próximos dos estequiométricos (RABELO, 2010).

Em Pernambuco, das dezoito unidades de produção de etanol de cana-de-açúcar, não se tem dados aprofundados sobre o potencial de produção de etanol de segunda geração. Apesar do aumento da destinação da cana para produção de etanol hidratado (CONAB, 2016), não se pode afirmar que a procedência deste seja, mesmo que em pequeno percentual, proveniente de materiais lignocelulósicos. Em função disto, estudos acerca do potencial bioenergético da cana-de-açúcar são necessários para a caracterização das novas variedades como promissoras ou não para a obtenção de etanol de primeira e segunda geração.

Neste contexto, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o potencial de produção de etanol de primeira e de segunda geração em primeira e segunda socas para variedades de cana-de-açúcar em Pernambuco. Especificamente, objetivou-se avaliar o efeito da adução nitrogenada de 0, 40 e 80 Kg. ha⁻¹ de N, sobre o desempenho agroindustrial de cinco variedades de cana; caracterizar quimicamente a biomassa lignocelulósica; estimar o potencial de produção de etanol de primeira e segunda geração e verificar a eficiência de processos de conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PANORAMA DA PRODUÇÃO CANAVIEIRA NO BRASIL E EM PERNAMBUCO

O Brasil é hoje o principal produtor mundial de cana-de-açúcar, e este setor de produção responde por cerca de um milhão de empregos, que representam 6% dos empregos na agroindústria nacional (CIB, 2015). Número considerável de 70 mil fornecedores independentes de cana que junto com a agroindústria geram 13 bilhões de reais em impostos e taxas (NEVES E CONEJERO, 2010).

O cultivo da cana-de-açúcar estabeleceu-se sobre os mais diferentes tipos de solos no território nacional, desde solos de textura arenosa a muito argilosos, assim como em solos com altos teores de matéria orgânica. A cultura é bem tolerante à acidez e à alcalinidade, desenvolvendo-se em solo com pH desde 4,0 até 8,3 (BASANTA, 2004). Devido à grande importância que assumiu para a economia nacional através da produção de álcool etílico impulsionado em meados da década de 1970 pelo Programa Nacional do Álcool (Proálcool), a cultura de cana-de-açúcar expandiu-se por muitos dos estados brasileiros.

A região Sudeste é responsável pela produção de 62% de toda cana produzida a nível nacional. São Paulo, maior produtor, possui 52% (4.678,7 mil hectares), seguido por Goiás com 10,1% (908 mil hectares), Minas Gerais com 9% (811,2 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 7,5% (677,9 mil hectares), Paraná com 6,6% (596 mil hectares), Alagoas com 3,8% (338,3 mil hectares), Pernambuco com 2,9% (264 mil hectares). Esses estados são responsáveis por mais de 90% da produção nacional de cana-de-açúcar (CONAB, 2015).

Pernambuco possui, atualmente (safra 2015/2016), 273 mil hectares de cana-de-açúcar, resultando numa produção de 15.464 mil toneladas. Hoje, é o segundo maior produtor de cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil. Na safra 2014/2015 foram plantados 284 mil ha, com uma produtividade média de 51 Mg. ha⁻¹ (CONAB, 2015), valor muito abaixo dos 82 Mg. ha⁻¹ obtidos na mesma safra em São Paulo.

Vários fatores interferem na produção e maturação da cultura da cana-de-açúcar, sendo os principais a interação edafoclimática, o manejo da cultura e a cultivar escolhida (CESAR et al., 1987). Em função da alta abrangência da cultura a nível nacional, de modo

geral, o país tem dois calendários de colheita, um para a Região Nordeste, que vai de setembro a abril e outro para o restante do país, de maio a novembro.

2.2 NITROGÊNIO NO CULTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR

O nitrogênio é um dos elementos que mais limitam o crescimento da vegetação e a produção agrícola. No solo, o N encontra-se distribuído em vários compartimentos como N_2 , N-orgânico, $N-NH_4^+$ e $N-NO_3^-$. Cerca de 50% de N do solo encontra-se em formas quimicamente estáveis, com os maiores reservatórios muito pouco reativos, com tempo médio de residência estimado em 175 anos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Em associação com os fertilizantes nitrogenados aumenta-se a disponibilidade desses íons no solo e tem-se o contato íon-raiz e a absorção do nutriente pela planta. Para aumentar o nitrogênio disponível pelas plantas e conseqüentemente a produtividade da cana-de-açúcar é importante favorecer a mineralização do N-orgânico e diminuir as perdas do nutriente, seja por volatilização, desnitrificação ou lixiviação (VALE, 2009).

De acordo com Sampaio et al. (1984), a contribuição do N proveniente do fertilizante para a cultura em cana-planta pode ser pequena, indo de 10%, até cerca de 15% (SALCEDO & SAMPAIO, 1987) do total de N absorvido pela planta. Ao passo que Trivelin et al. (2002), estudaram o acúmulo de N na parte aérea da cultura, tendo obtido valores da ordem de 200 kg. ha⁻¹, sendo 20% desse valor derivado do fertilizante.

O ciclo da cana de açúcar (cana-planta ou socarias) condicionará o potencial de absorção de N pelas plantas. Sendo este potencial reduzido consideravelmente nas socarias que seguem. No Brasil, são depositados em média por meio do processo de fertilização nitrogenada cerca de 80 kg.ha⁻¹, tendo sido observado absorção de 120 kg do elemento por hectare (BASANTA, 2004).

Em cana-de-açúcar, as formas de N absorvidas pelas raízes podem ser usadas pelas próprias células radiculares para sintetizarem compostos orgânicos, ou podem ser diretamente transportadas, por fluxo de massa das raízes à parte aérea, onde ocorre a sua assimilação (SILVA E CASAGRANDE, 1983). Sabe-se que o fluxo de N é dirigido aos locais de demanda metabólica e não aos locais de déficits nutricionais (BURR E TAKAHASHI, 1955).

Normalmente a síntese protéica ocorre nos tecidos foliares, meristemas e raízes e os excessos de N muito provavelmente seriam armazenados nas juntas basais na forma de amônio, aminoácidos e peptídeos, que estariam disponíveis à planta, quando e onde fossem necessários. Assim sendo, a condição da planta, deficiente ou não, determinaria a eficiência

de absorção do nitrogênio. Todavia, existem evidências que a maior parte do N absorvido seja acumulada nos colmos na fase jovem da planta (VALE, 2009).

Gomes (2003) avaliou a absorção e o acúmulo de macronutrientes em doze variedades de cana-de-açúcar (terceiro corte) em dois tipos de solos verificou que a concentração de N variou de 0,70 kg. t⁻¹ (RB 845257) até 0,99 kg. t⁻¹ (SP 801842) e média de 0,84 kg t⁻¹ em Latosso Vermelho Amarelo Distrófico psamítico. Em Nitossolo Vermelho Eutroférico Latossólico, o teor de N variou de 0,54 kg. t⁻¹ (RB835089) até 0,98 kg. t⁻¹ (RB825336) e média de 0,68 kg. t⁻¹, o que evidenciou que o acúmulo de N pelas plantas depende do material varietal bem como ambiente de produção.

2.3 MANEJO DA PALHADA NO CULTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Para garantia de altas produtividades, o cultivo da cana-de-açúcar precisa ser manejado adequadamente, sendo fornecidos ao sistema todos os tratos possíveis que assegurem a sustentabilidade do canavial. Durante muitos anos, foi prática usual nas diversas regiões canavieiras do Brasil e do mundo, queimar a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) antes da colheita (WOOD, 1991; TRIVELIN et al.,1997). Entretanto, nos últimos anos, a área total de cana colhida mecanicamente, sem a prévia despalha a fogo, tem crescido em São Paulo e em outros estados produtores de cana, exceto em Pernambuco, onde a grande maioria das áreas produtoras tem relevo acidentado, tornando inviável a entrada de colheitadeiras (SEABRA, 2008).

No sistema de colheita de cana sem a prévia despalha a fogo, as folhas secas, verdes e os ponteiros são cortados e deixados sobre a superfície do solo, formando uma cobertura morta denominada palhada. Essa camada de material vegetal remanescente sobre a superfície apresenta inúmeras vantagens: aumenta a infiltração de água no solo, diminui a erosão e a evaporação edáfica, melhora a estrutura do solo e aumenta a sua capacidade de troca catiônica (CTC), além de servir como fonte de nutrientes para a macro e a microflora do solo e para a própria cultura da cana-de-açúcar (WOOD, 1991).

Na colheita de cana-de-açúcar com despalha a fogo, quantidades importantes de elementos essenciais são perdidas para a atmosfera, dentre eles o nitrogênio, na forma de óxidos. A colheita de cana crua permite, portanto, que os nutrientes contidos na palhada permaneçam no campo e sejam reciclados no sistema. Assim, a maior parte do N contido nos resíduos passa a formar parte da matéria orgânica do solo. Com o tempo, um equilíbrio pode ser alcançado quando a taxa de incorporação do nitrogênio dos resíduos na matéria orgânica

do solo for similar à taxa de mineralização do nitrogênio orgânico, mantendo estável o conteúdo de N no sistema (BASANTA, 2004).

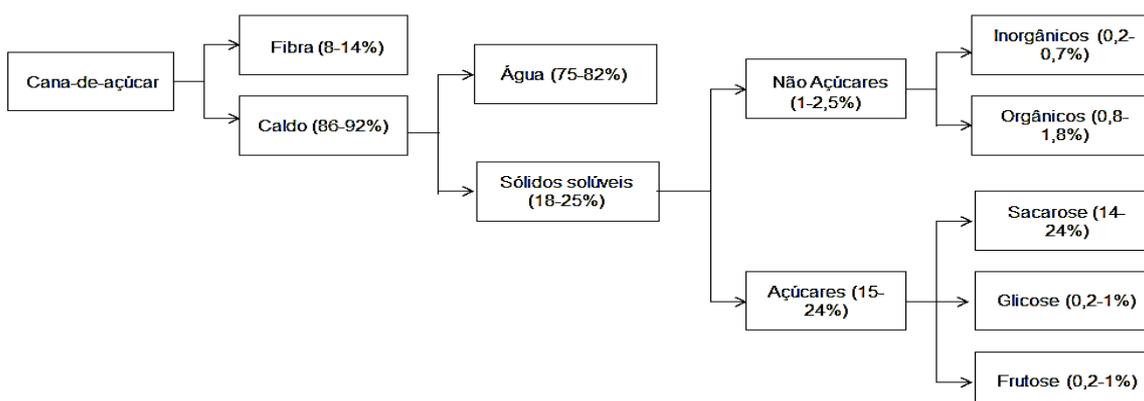
2.4 VARIÁVEIS AGROINDUSTRIAIS DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO BIOENERGÉTICA

O manejo adequado no cultivo da cana, associado às características próprias da variedade, permite a obtenção de um melhor material para ser processado na indústria, onde, serão consequentemente obtidos produtos de qualidade. A forma de avaliar a qualidade dessa matéria-prima deve, portanto, ser adequada a tais características, bem como atender às necessidades requeridas pelo produtor, que permitam o cultivo econômico da cana-de-açúcar e atendam às necessidades da indústria.

A qualidade da cana-de-açúcar como matéria-prima pode ser definida como uma série de características intrínsecas da própria planta alteradas pelo manejo agrícola e industrial, as quais definem seu potencial para obtenção de seus principais produtos e subprodutos (FERNANDES, 2000). A princípio, esta definição compreendia os colmos industrializáveis e as impurezas presentes no material, geralmente composta por pequena parte da palhada e plantas daninhas carregadas durante o processo de transporte. Atualmente, o termo ‘impureza’ não deve ser considerado para descrever quaisquer resquícios da palha, uma vez que esta apresenta enorme potencial bioenergético e deve ser considerada no processo agroindustrial.

De acordo com Waldemar (2007), a cana é composta por fibra e caldo, sendo as fibras consideradas os sólidos insolúveis e o caldo composto por água e por sólidos solúveis, que são açúcares e não açúcares. Tal composição é apresentada em valores percentuais estimados na figura 2.

Figura 1 – Composição da cana-de-açúcar. Adaptado de Waldemar (2007).



O teor de fibras é um importante parâmetro a ser considerado em sistemas de aproveitamento parcial e/ou integral da palhada para obtenção de etanol de segunda geração, bem como no aproveitamento do material remanescente da moagem (bagaço) com esta mesma finalidade ou para geração de eletricidade.

A fibra constitui-se ainda em matéria de grande importância do ponto de vista agrícola. As variedades mais ricas em fibras têm maior resistência ao tombamento, mesmo quando submetidas à despalha a fogo, e geralmente são mais resistentes ao ataque das pragas do colmo, como é o caso da broca *Diatraea saccharalis* (LAVANHOLI, 2008).

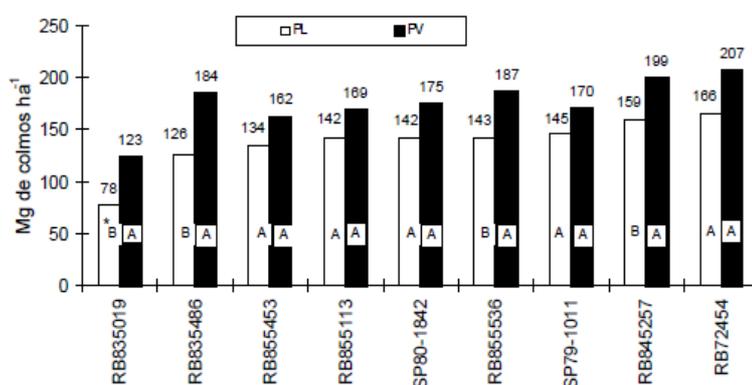
Outro parâmetro agroindustrial a ser considerado é a pol (pol%caldo), que representa a porcentagem aparente de sacarose contida numa solução de açúcares (caldo da cana). A sacarose é o principal açúcar constituinte do caldo da cana e o seu teor está relacionado com o ponto da maturação da cultura.

O fator produtividade é considerado desde a escolha das variedades e o seu valor é estimado em toneladas de cana por hectare (TCH). Um TCH alto é indicativo de que determinada variedade produzirá grande quantidade de colmos atendendo satisfatoriamente às expectativas de produção do setor.

Maule et al. (2001) estudaram diferentes variedades de cana-de-açúcar em dois tipos de solos tendo obtido os valores de TCH (gráfico 1) médios para três ciclos de cultivo (cana-planta, primeira e segunda socas).

Figura 2 – Produção agrícola média das cultivares em Planossolo mesotrófico textura arenosa/média (PL) e Podzólico Vermelho Amarelo mesotrófico textura arenosa/média (PV).

Fonte: Maule et al. (2001).



*Letras maiúsculas correspondem às comparações entre solos para uma mesma cultivar pelo teste de Tukey com nível de significância (α) 0,05.

As variedades de cana-de-açúcar estudadas neste trabalho apresentaram comportamentos de produtividade agrícola diferentes nos dois solos. A produtividade média da cana-planta no PV (175 mg.ha⁻¹) foi 28% maior que a obtida no PL (137 mg.ha⁻¹) ressaltando a existência de uma variação no potencial de produtividade de colmos entre os solos, o que enfatiza o papel do ambiente e manejo adequado na produtividade de colmos de cultivares da cana-de-açúcar.

Outra variável utilizada na indústria sucroenergética, o brix (brix%caldo), expressa a porcentagem (peso/peso) dos sólidos solúveis contidos em uma solução pura de sacarose, ou seja, mede o teor de sacarose da solução. Segundo Lavanholi (2008), admite-se então que o brix é a porcentagem aparente dos sólidos solúveis contidos em uma solução açucarada impura, como é o caso do caldo da cana.

O teor dos açúcares totais recuperáveis (ATR) é uma das variáveis do sistema de pagamento da cana e representa a quantidade de açúcares redutores totais (ART) recuperados da cana até o xarope. Os açúcares redutores totais são, portanto, a somatória dos açúcares redutores (glicose e frutose) já presentes no caldo e a glicose e frutose formados a partir do processo de hidrólise da sacarose. De acordo com Fernandes (2000) são representados por todos os açúcares do material na forma de açúcar invertido.

As variáveis agroindustriais da cana-de-açúcar refletem o real potencial produtivo de seus principais subprodutos, devendo-se atentar para a qualidade da matéria-prima nas diferentes etapas do processo de obtenção de seus derivados. O conhecimento de tais parâmetros garante o aproveitamento integral da cana-de-açúcar como provedora de energia, garantindo a sustentabilidade nas etapas agrícola e industrial, de forma a contribuir para que o balanço energético seja positivo no sistema de produção canavieiro.

2.5 PRODUÇÃO DE ETANOL NO BRASIL

A iminente escassez das reservas de petróleo, principal fonte energética mundial, juntamente com as preocupações da sociedade com a preservação ambiental, são os principais motivos que levaram os governos a buscarem estratégias para uma maior produção e maior consumo de combustíveis que sejam renováveis e sustentáveis. De acordo com Andreoli e Souza (2007), os biocombustíveis devem apresentar ganho de energia líquida, benefícios ecológicos, serem economicamente competitivos e produzirem sem competir com o abastecimento de alimentos.

O etanol é o álcool etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) produzido pela fermentação dos açúcares encontrados no caldo da cana (etanol de primeira geração) ou por meio da biomassa lignocelulósica (etanol de segunda geração) após sua conversão em açúcares fermentáveis, podendo independentemente de sua forma de obtenção, ser classificado em anidro e hidratado, com teores alcoólicos mínimo de 99,3° e 92,6°, respectivamente (CHIEPPE JR., 2012). O etanol anidro tem teor de água em torno de 0,5% em volume e é utilizado em mistura com a gasolina, ao passo que o etanol hidratado é utilizado diretamente como combustível e possui cerca de 5% de água em volume.

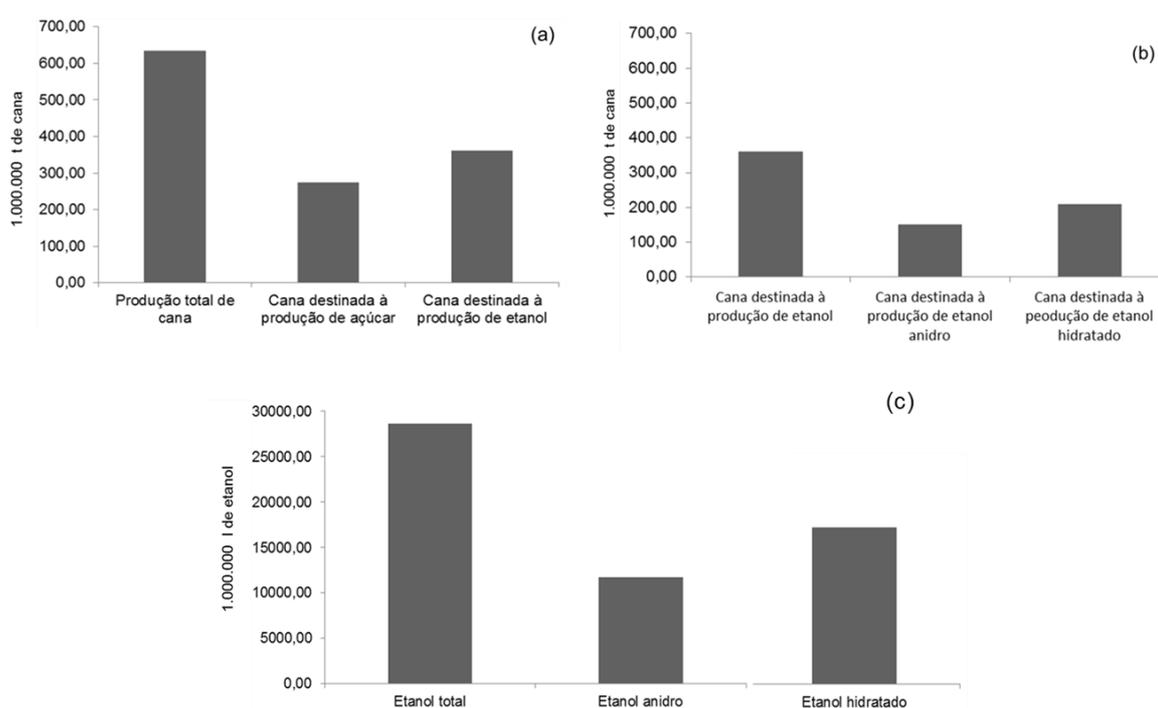
De acordo com o Conselho dos Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo – CONSECANA (2006), os valores relativos totais de ATR são também responsáveis pela prévia determinação do potencial de produção dos subprodutos da cana. Em termos gerais, para a produção de um litro de álcool anidro e hidratado, há necessidade de 1,7651 e 1,6913 kg de ATR, respectivamente.

O etanol produzido da cana-de-açúcar produz 9.3 unidades de energia renovável para cada unidade de combustível fóssil utilizado para sua produção. Outras fontes (milho, beterraba e grãos) geralmente utilizadas em outros países raramente ultrapassam duas unidades (ABRAMOVAY, 2009). Com isso, a cana-de-açúcar apresenta-se como a melhor alternativa da atualidade para a produção de etanol, além de contribuir para a diversificação da matriz energética, oferecendo ainda a eletricidade proveniente do bagaço.

O Programa Nacional do Álcool (Proálcool) foi criado em meados da década de 1970 a fim de desenvolver técnicas e aperfeiçoar os insumos para a produção de álcool etílico (ANDRADE et al., 2009). O auge do Proálcool foi alcançado na década de 1980, quando a política de preços tornou o álcool bem mais barato do que a gasolina, levando a produção de etanol a mais do que triplicar entre 1979 e 1985 (em 1984, os carros a álcool respondiam por 94,5% da produção das montadoras). A indústria do álcool substituiu, desde 1976, mais de 1,44 bilhão de barris de petróleo e a economia de divisas com a substituição do petróleo foi de cerca de US\$ 120 bilhões, entre 1979 e 2004 (BASTOS, 2007). Esta evolução no uso do etanol como combustível veicular, principalmente após o advento dos veículos bicombustíveis no início dos anos 2000, transformou a cana-de-açúcar na segunda mais importante fonte primária e na principal forma de energia renovável da matriz energética brasileira. Constitui um mercado em ascensão para um combustível obtido de maneira renovável e para o estabelecimento de uma indústria sustentada na utilização de biomassa de origem agrícola e renovável.

De acordo com a Companhia Nacional do Abastecimento (CONAB, 2015) na safra 2014/2015, o Brasil produziu 28,66 bilhões de litros de etanol, sendo 41% desse total anidro e 59% hidratado (Figura 3). Pernambuco destinou para o mesmo período, cerca de 34% de sua produção total de cana para obtenção de etanol, tendo produzido cerca de 342 milhões de litros entre anidro e hidratado, o que representou 1,2% da produção nacional.

Figura 3 – (a) Produção total de cana-de-açúcar e destinação à produção de açúcar e etanol, (b) produção de cana total destinada à produção de etanol e à produção de etanol anidro e hidratado, (c) produção total de etanol, etanol anidro e hidratado, a nível nacional. Fonte: CONAB (2015).



Os dados do ultimo levantamento da CONAB demonstram ainda que houve migração do ATR total da indústria para a produção de etanol. De acordo com a companhia, nesta safra (2015/2016), a tendência é que ocorra uma redução significativa na destinação da cana-de-açúcar a ser esmagada para a produção de açúcar (5,3%) e um aumento significativo (24,8%) para a produção de etanol em face da conjuntura dos preços. O etanol anidro deve sofrer nesta safra uma redução de 8,5% na produção, enquanto o hidratado deve sofrer aumento de 73,3%. Esse aumento se deve principalmente ao preço mais compensador do produto, que impulsionou as empresas a direcionarem parte ou toda a produção de cana-de-açúcar para sua fabricação.

2.6 OBTENÇÃO DE ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO A PARTIR DO CALDO DA CANA-DE-AÇÚCAR

O etanol obtido do caldo de cana-de-açúcar (etanol de primeira geração) é, até o momento, o único combustível com capacidade de atender à crescente demanda por energia renovável de baixo custo e de baixo poder poluente. Deve-se considerar que as emissões gasosas com a queima do etanol são da ordem de 70% menores que as emissões da queima da gasolina, sendo ainda que o CO₂ emitido é reabsorvido pela própria cana (SEABRA, 2008).

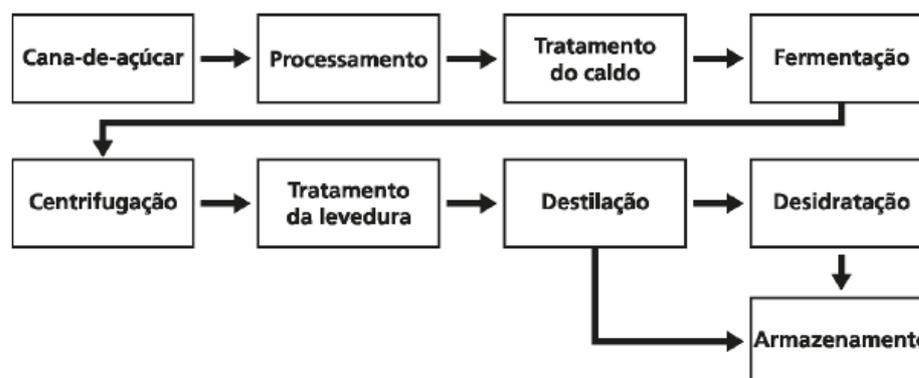
O caldo da cana depois de extraído passa por processo de clarificação, que consiste na remoção de impurezas grossas. Para isso, o material é previamente peneirado e posteriormente tratado com agentes químicos para coagular parte da matéria coloidal (ceras, graxas, proteínas, gomas, pectinas, corantes), precipitar certas impurezas (silicatos, sulfatos, ácidos orgânicos, Ca, Mg, K, Na) e modificar o pH (ANDRADE E CASTRO, 2006). Meneguetti et al. (2010) descreveram cinco processos de clarificação do caldo de cana: caleação (CaO), sulfitação (SO₂), fosfatação (P₂O₅), carbonatação (CO₂) e uso de óxido de magnésio.

Após a obtenção do mosto nas destilarias, este é enviado às dornas de fermentação onde serão adicionados microrganismos (*Saccharomyces cerevisiae*) responsáveis por transformar o mosto em gás carbônico e álcool. Tais microrganismos desempenham melhor sua atividade à temperatura de 32 a 34° C (ALCARDE, 2007). O vinho que vem da fermentação possui, em sua composição, 7° a 10°GL (% em volume) de álcool, além de outros componentes de natureza líquida, sólida e gasosa. Dentro dos líquidos, além do álcool, encontra-se a água com teores de 89% a 93%, glicerol, álcoois homólogos superiores, furfural, aldeído acético, ácidos succínico e acético entre outros, em quantidades bem menores. Já os sólidos são representados por bagacilhos, leveduras e bactérias, açúcares não fermentescíveis, sais minerais, matérias albuminóides entre outros, e os gasosos, principalmente pelo CO₂ e SO₂ (PAYNE, 1989).

O álcool presente no vinho é recuperado por destilação. Nesse processo são utilizadas as diferenças de ponto de ebulição das diversas substâncias voláteis presentes, separando-as. A operação é realizada a nível industrial com auxílio de sete colunas distribuídas em quatro troncos (MENEGUETTI et al. 2010). O álcool resultante desse processo é uma mistura binária álcool-água (hidratado) que atinge um teor da ordem de 96°GL, podendo ser comercializado desta forma ou passar por desidratação (anidro).

De maneira geral, o fluxograma da produção de etanol de primeira geração é apresentado na figura 4.

Figura 4 – Fluxograma da produção de etanol. Fonte: Chieppe Jr. (2012).



2.7 OBTENÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Atualmente, o etanol é produzido praticamente a partir de matérias-primas sacarinas ou amiláceas, cana-de-açúcar e milho, respectivamente (SANTOS et al., 2012). Porém, o recurso biológico mais abundante do planeta é a biomassa lignocelulósica, que em cana-de-açúcar representa 1/3 do potencial bioenergético (CARVALHO, 2012), podendo ser aproveitada para produção de etanol (etanol de segunda geração). Em função disso, muitos são os esforços da comunidade científica para desenvolvimento de tecnologias capazes de tornar este material passível de utilização para obtenção do combustível.

A tecnologia da produção de etanol de segunda geração baseia-se na conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis. Para que isso ocorra, o material deve passar por pré-tratamentos de natureza química (líquidos iônicos, agentes oxidantes, ácidos, álcoois, solventes orgânicos), física (tratamento mecânico por trituração, moagem, ultrassons e micro-ondas), biológica (ação de micro-organismos) e/ou a combinação (explosão a vapor d'água, fluidos supercríticos e a auto hidrólise com água líquida quente) de mais de um destes. Tais pré-tratamentos são responsáveis em disponibilizar os carboidratos que após processo de hidrólise serão convertidos em açúcares passíveis de serem fermentados. Esta tecnologia vem sendo considerada como uma alternativa promissora para atender à demanda mundial por combustíveis de origem renovável, apesar de serem encontradas dificuldades técnicas ou econômicas (SANTOS et al., 2012).

O processo de obtenção de etanol de segunda geração envolve quatro etapas: (i) pré-tratamento, para romper a estrutura cristalina da celulose (ii) hidrólise enzimática, para hidrolisar os polissacarídeos em açúcares fermentescíveis; (iii) fermentação, para converter os açúcares em etanol e a (iv) destilação, que visa a separação de componentes de uma mistura, de acordo com a volatilidade relativa dos componentes (SANTOS et al., 2014).

De acordo com Zhang (2008), uma tonelada de matéria seca produz entre 80 e 130 galões de etanol celulósico. Já Ripoli (2000) estimou que uma tonelada de palha de cana de açúcar fosse responsável por produzir algo em torno de 50,4 a 117,6 galões de etanol de segunda geração, sendo, desperdício energético sua não utilização.

Segundo Santos et al. (2012), em termos gerais, o rendimento teórico da produção de etanol proveniente da palhada em cana-de-açúcar considerando apenas a conversão da celulose é de 3444 litros. ha⁻¹, o mesmo valor observado para o bagaço, ocorrendo portanto, em sistemas de aproveitamento total da biomassa lignocelulósica a duplicação do rendimento total em etanol, quando somados aos 7000 litros.ha⁻¹ do produto de primeira geração, já convencionalmente produzidos em sistemas comuns.

As tendências atuais sinalizam como tecnologia emergente a produção de etanol combustível a partir de materiais lignocelulósicos como matéria-prima. Neste caso, o processo apresenta vantagens e desvantagens. As principais vantagens são: o baixo custo da matéria-prima (geralmente resíduo da agroindústria); a disponibilidade do material; a não dependência ao aumento das áreas de cultivo e o alto conteúdo de açúcares na estrutura do material. Como desvantagens encontram-se, principalmente: a necessidade de pré-tratamentos do material como etapa crucial para a disponibilização dos açúcares; a presença de carboidratos não fermentáveis por microrganismos comumente utilizados, como *S. cerevisiae*, por exemplo, e, em alguns casos, a necessidade de processos de destoxificação dos meios segundo as condições do pré-tratamento e o microrganismo a ser empregado. Por apresentar tamanha complexidade, tal processo requer maiores investimentos, tanto de capital quanto de pesquisa (PHILIPPIDIS & HATZIS, 1997).

2.6.1 Composição lignocelulósica

Os açúcares presentes na palha de cana-de-açúcar encontram-se na forma de polímeros (celulose e hemicelulose) e são recobertos por uma macromolécula (lignina), formando a microfibrila celulósica. Devido à sua interação intermolecular e completa

ausência de água na estrutura da microfibrila, a celulose apresenta estrutura bastante recalcitrante, difícil de ser desestruturada e convertida em monossacarídeos fermentescíveis (SANTOS et al., 2012).

A celulose e a hemicelulose são polissacarídeos, estando a celulose geralmente presente na forma cristalina e uma pequena quantidade amorfa, que são cadeias de celulose não organizadas, sendo, nesta última formação, mais suscetível à degradação enzimática. A celulose aparece associada a outros compostos na planta e essa associação pode afetar a sua biodegradação (PÉREZ et al., 2002). A hemicelulose apresenta massa molecular menor que a celulose e a principal diferença entre ambas é que a hemicelulose tem bandas com curtas cadeias laterais constituídas de diferentes açúcares e a celulose consiste de oligômeros facilmente hidrolisáveis (PITARELO, 2007).

A lignina é ligada tanto à celulose quanto à hemicelulose formando uma barreira física impenetrável, está presente na parede celular vegetal e é responsável por dar suporte estrutural, garantir impermeabilidade e resistência ao ataque microbiano e estresse oxidativo (SANCHÉZ, 2009).

Em termos gerais, a biomassa lignocelulósica é composta de 10-25%, de lignina, 35-50% de celulose e 20-35% de hemicelulose, sendo seus demais componentes uma pequena fração de cinzas e extrativos (SANTOS et al., 2012). Gomez et al. (2010) estudaram tal composição para cana-de-açúcar, ocorrendo de 40-44% de celulose, 30-32% de hemicelulose e 20-25% de lignina para palhada e 32-48% de celulose, 19-24% de hemicelulose e 23-32% de lignina para o bagaço.

Zhao et al. (2008), estudando diferentes variedades de sorgo sacarino, propuseram que partindo-se dos teores de celulose e hemicelulose é possível estimar o potencial de produção de etanol de segunda geração de acordo com a equação 1.

$$Etanol (2G) = \frac{(celulose + hemicelulose) \times MS \times 1,11 \times 0,85 \times 0,51 \times 0,85}{0,79} \times 1000 \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde: Etanol (2G) é a produtividade de etanol de segunda geração em L.ha⁻¹, celulose + hemicelulose são os teores percentuais dos carboidratos na matéria seca da cana, MS é o teor de matéria seca por hectare, 1,11 o fator de conversão de açúcar a partir de celulose e hemicelulose, 0,51 o fator de conversão de etanol a partir do açúcar, 0,85 no primeiro caso trata-se da eficiência do processo para obtenção de açúcar a partir de celulose e hemicelulose,

trantando-se no segundo caso da eficiência do processo da obtenção de etanol a partir do açúcar e 0,79 é a densidade específica do etanol em g. mL⁻¹.

2.6.2 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

No processo de pré-tratamento, a lignina e a hemicelulose são alteradas ou removidas, visando aumentar a área superficial e diminuir o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, o que acarreta em um aumento na digestibilidade do complexo enzimático e, conseqüentemente, em elevados rendimentos em açúcar (WOOLEY et al., 1999; ZHANG & LYND, 2004; CANILHA et al., 2010).

Segundo Morais (2010), sem o pré-tratamento, a ação das enzimas é lenta e com rendimentos inferiores a 20%. A utilização desta etapa resulta em rendimentos superiores a 80%. Dentre os diferentes pré-tratamentos existentes (tabela 1), Moiser et al. (2005) destacaram a explosão a vapor, AFEX e a utilização de ácido diluído como os métodos mais eficazes na obtenção de etanol de segunda geração. Já Dutra (2014) obteve resultados satisfatórios em rendimento e produtividade de etanol utilizando peróxido de hidrogênio alcalino (H₂O₂).

O H₂O₂ é um forte agente oxidante e atua tanto em soluções básicas quanto ácidas, é muito versátil por apresentar seletividade diferenciada quando submetido em condições específicas, ou seja, a variação de temperatura, concentração, tempo reacional e a adição ou não de catalisadores pode tornar o peróxido de hidrogênio um forte agente redutor, capaz de oxidar diferentes espécies. O peróxido de hidrogênio tem grande aplicação nas indústrias químicas em reações de oxidação e indústrias de papel e celulose como agente branqueador, por permitir a retirada da lignina que possui uma tonalidade escura (ASSUMPCÃO, 2015) e ainda se dissocia em espécies altamente reativas de oxigênio, que são os superóxidos e os radicais hidroxila. Os radicais que são derivados de H₂O₂ exigem uma ação oxidativa que promove a despolimerização da lignina e a fragmentação da macroestrutura desta pelo ataque às ligações carbono – carbono (SELIG et al, 2009).

De acordo com Gould e Freer (1984) o pré-tratamento de biomassas com solução diluída de peróxido de hidrogênio é capaz de remover cerca de 50% da lignina tornando a celulose mais disponível. Dawson e Boopathy (2008) encontraram valores de redução de lignina acima de 60%, já Reis et al. (2016) observaram valores de deslignificação em torno de 45% para bagaço de cana-de-açúcar e 78% para sorgo.

A escolha de um pré-tratamento efetivo depende do fato deste necessitar obedecer a uma série de características: resultar em uma elevada recuperação de todos os carboidratos; em uma elevada digestibilidade da celulose na hidrólise enzimática subsequente; em uma elevada concentração de sólidos, além de uma elevada concentração de açúcares livres na fração líquida (ZHENG et al., 2009); requerer uma baixa demanda energética (GALBE & ZACHI, 2011); evitar a formação de subprodutos (TAHERZADEH & KARIMI, 2008); além de requerer baixo investimento e custo operacional.

Tabela 1 – Efeitos de diferentes pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos. Fonte: Adaptado de Santos et al. (2012).

Pré-tratamento	Características composicionais			Vantagens	Desvantagens	
	Celulose	Hemicelulose	Lignina			
Físico	Moinho de bolas	Intensiva diminuição do grau de cristalinidade	Não remove	Não remove	Redução de cristalinidade	Alto consumo de energia
Químico	Ácido diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Condições médias, altas produção de xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso
	Hidróxido de sódio	Inchação significativa	Considerável solubilidade	Considerável solubilização, >50%	Remoção efetiva de ésteres	Reagente caro, recuperação alcalina
	ARP	Menor que 5% de despolimerização	~50% de solubilidade	~70% de solubilização	Efetiva deslignificação	Recuperação alcalina, relativamente caro
	Hidróxido de cálcio	Pouca despolimerização	Significativa solubilização	Solubilização parcial (~40%)	Efetiva remoção de lignina e acetil, baixo custo	Menor efetividade devido a pouca solubilidade da cal
	Ozonólise	Não foi observada despolimerização	Pequena solubilização	Solubilização acima de 70%	Efetiva deslignificação em condições suaves	Caro, necessidade de mais ozônio
	Organosolve	Considerável inchação	Significativo, quase completa	Significativo, pode ser quase completa	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação	Recuperação de solvente cara
	H ₂ O ₂	Maior disponibilização	Não remove	Consideráveis solubilização e remoção	Alta solubilização da lignina	Necessidade de grande quantidade de água para remoção de compostos residuais
Biológico	Biológico	20-30% de despolimerização	Acima de 80% de solubilização	~40% de deslignificação	Baixo requerimento (energia), boa deslignificação	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise
Combinado	Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	Degradação da xilana como produto inibitório
	AFEX	Diminuição do grau de cristalinidade	Acima de 60% de solubilidade	10-20% de solubilização	Menor perda de xilanas, não formação de inibidores	Recuperação de amônia, não é efetivo para alta concentração de lignina

2.6.3 Hidrólise de materiais lignocelulósicos

Após o pré-tratamento, o material é submetido à hidrólise enzimática ou ácida, onde serão disponibilizados os açúcares que passarão por processo de fermentação, sendo obtido assim o etanol de segunda geração após a destilação.

O processo de hidrólise enzimática configura-se como o método mais eficaz para os processos fermentativos, pois não gera produtos que inibam o metabolismo das leveduras e produz eficientemente uma mistura de açúcares passíveis de fermentação (DUTRA et al., 2014). A utilização de enzimas configura-se como um método mais eficaz de hidrólise que a utilização de ácidos (ARAÚJO, 2016), pois estas apresentam propriedades para atuação como catalisadores, por serem bastante ativas, versáteis e executar uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido e em condições brandas de reação, ou seja, não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH (BORTOLAZZO, 2011). No entanto, o custo econômico da utilização de enzimas pode variar de 25% a 50 % do custo de produção total de etanol de segunda geração (ZHANG, 2008).

De acordo com Araújo (2016), o rendimento da hidrólise enzimática depende de muitos fatores: tipo de pré-tratamento do substrato, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da deslignificação, termoestabilidade das enzimas, concentração e adsorção do substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, concentração do substrato no meio e agitação. A hidrólise enzimática conduz a rendimentos mais elevados de monossacarídeos do que a hidrólise ácida, porque as enzimas celulases catalisam somente as reações de hidrólise e não as reações da degradação do açúcar (PARISI, 1989).

2.6.3.1. Enzimas celulases

Durante o processo de hidrólise, enzimas celulases são responsáveis por hidrolisar a celulose e em alguns casos, a depender da especificidade da enzima, a hemicelulose. Porém, para garantia de conversão dos polissacarídeos, necessitam-se altas concentrações de enzima, o que aumenta o custo de produção (RABELO, 2010).

A hidrólise da celulose e hemicelulose por celulases resulta na produção final de glicose (THIEMANN et al., 1980). A hidrólise enzimática é uma reação heterogênea catalisada pelas celulases, sendo caracterizada por um substrato insolúvel (celulose e hemicelulose) e um catalisador solúvel (enzimas). Assim, as características estruturais da celulose e hemicelulose e o modo de ação das enzimas influenciam na taxa de reação. A

susceptibilidade destes componentes ao ataque enzimático é determinada pela acessibilidade dos sítios de ligação para a celulose e hemicelulose, o que determina a subsequente adsorção da enzima no substrato sólido (RABELO, 2007).

É reconhecida a existência de três tipos de celulases: endoglicanases, exoglicanases ou celobiohidrolases e β -glicosidase ou celobiase (BHAT e BHAT, 1997; MANI et al., 2002; GAN et al., 2003). As moléculas de celulose são organizadas em forma de feixes fibrosos e estes feixes apresentam duas regiões bastante distintas (Figura 5). Cada tipo de celulase atacará, então, uma região específica (RABELO, 2007).

Figura 5 – Regiões específicas da celulose. Fonte: Rabelo, 2007.



As endoglicanases hidrolisam preferencialmente as ligações internas no polímero da celulose (região amorfa), produzindo oligossacarídeos de menor peso molecular, chamados de celodextrinas, além de celobiose, resultando em uma rápida diminuição da viscosidade e aumento relativamente pequeno do poder redutor (WOOD, 1988; HEIKINHEIMO, 2002). Assim, as endoglicanases atacam de forma mais ou menos aleatória as ligações β -(1-4)-glicosídicas em regiões amorfas da celulose ou na superfície das microfibrilas.

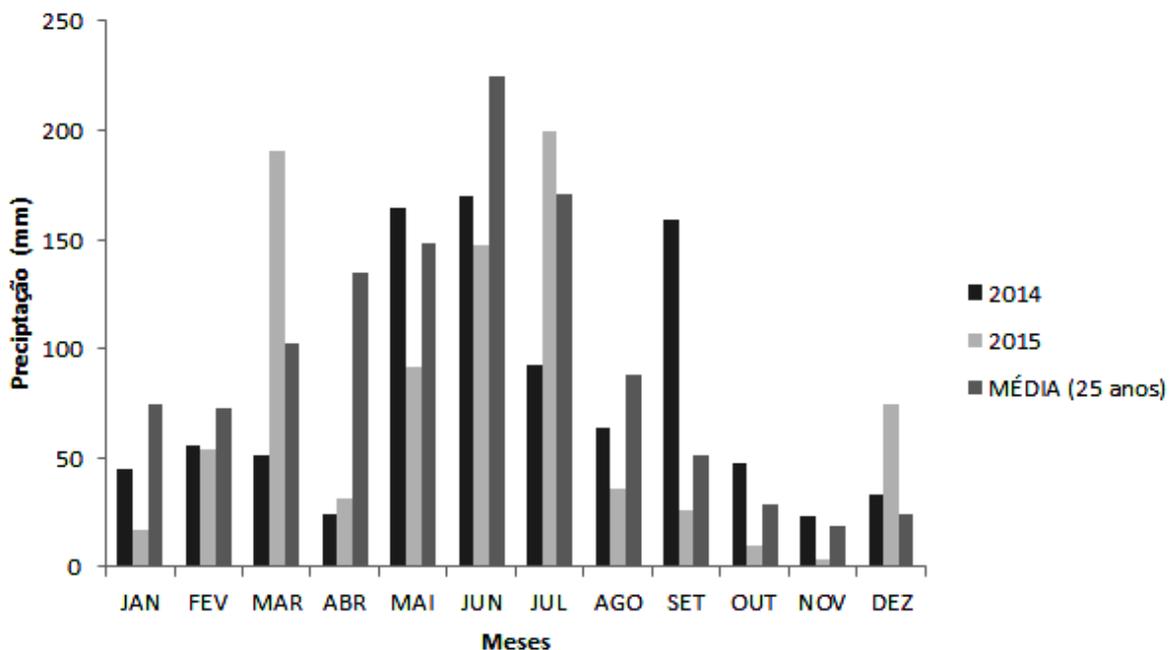
As exoglicanases iniciam a hidrólise nas extremidades da cadeia, e não produzem uma quantidade significativa de novas cadeias terminais na superfície da celulose (IRWIN et al., 1993; HEIKINHEIMO, 2002). São estas as responsáveis por liberar a celobiose rompendo as ligações β -(1-4)-glicosídicas. As celobiasas, por sua vez, completam a hidrólise catalisando a hidrólise da celobiose a glicose. Portanto, as celobiasas hidrolisam a celobiose e as celodextrinas solúveis em água à glicose (RABELO, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO DO EXPERIMENTO EM CAMPO

Foi realizado um experimento em campo na estação experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA, no município de Itambé, PE. A estação experimental ocupa uma área de 240 ha, está localizada na Zona da Mata Norte de Pernambuco (área de transição entre a zona da mata seca e agreste de Pernambuco). O clima nessa área é classificado como As' (Köppen) - tropical chuvoso (quente e úmido) com verão seco, pluviosidade de 927,7 mm acumulados na primeira soca (2014) e 879,6 mm na segunda (2015), temperatura média anual de 24,8°C, com máxima de 30°C e mínima de 20°C e umidade relativa do ar média de 80% (ENCARNAÇÃO, 1980). O solo predominante na estação é o Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico (FERREIRA et al., 2007).

Figura 6 – Precipitação no período experimental (2014 e 2015) e média de 25 anos, na estação experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco em Itambé - PE. Fonte: APAC (2017).



O delineamento experimental utilizado em campo foi em blocos casualizados em arranjo fatorial (5 x 3) representados pelas cultivares de cana-de-açúcar RB863129, RB92579, RB867515, RB962962 e RB931011 e os níveis de adubação nitrogenada testemunha (0 kg.

ha⁻¹ de N), 40 e 80 kg.ha⁻¹ de N na forma de ureia, com quatro repetições. As parcelas foram compostas de sete fileiras com 10 metros de comprimento e 1 m entre fileiras, totalizando 70m², área útil de 5 fileiras de 8m num total de 40m².

Em junho de 2012 foi realizado o plantio com rebolos, obedecendo a um padrão de 18 gemas por metro. A adubação foi realizada em função dos resultados de análise de solo (tabela 2), tendo sido aplicado fósforo na forma de supersimples (120 kg. ha⁻¹ de P₂O₅) e potássio na forma de cloreto de potássio (80 kg.ha⁻¹ de K₂O), conforme recomendação (IPA, 2008). Foi realizada a calagem com 1 Mg. ha⁻¹ de calcário dolomítico, 20 dias antes do plantio de acordo com a análise do solo.

Tabela 2 – Análises químicas do solo do campo experimental em profundidade coletado antes da calagem e adubação do experimento com cana-de-açúcar, no ano de 2012, na estação experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco em Itambé – PE. Fonte: Carvalho (2014).

Camada	pH	P	Ca	Mg	Na	K	Al	H	S	CTC ¹	V ²	m ³	N
	(H ₂ O)	mg/dm ³	cmol _c dm ⁻³							%			
0-20*	5,3	3	0,18	0,60	0,07	0,18	0,20	5,80	3,6	9,4	38	11	0,36
20-40	4,6	2	1,50	0,55	0,02	0,09	0,90	7,35	2,2	10,4	21	29	0,31
40-60	4,7	1	0,80	0,45	0,02	0,05	1,25	1,72	1,3	4,3	31	49	0,28
60-80	4,7	1	0,70	0,70	0,02	0,04	1,30	6,86	1,5	9,6	15	47	0,16

¹ Capacidade de troca de cátions; ² saturação de bases; ³ Saturação por alumínio.

*Textura franco arenosa e densidade aparente 1,37 g cm⁻³. (64% areia; 15% silte; 21% argila)

O experimento foi conduzido em condições de sequeiro, por três ciclos. Foram utilizados neste trabalho apenas os dados referentes as primeira e segunda socarias (ciclos de 2014 e 2015). A primeira colheita foi realizada aos 16 meses após o plantio (outubro/2013) e a colheita da primeira soca 12 meses após a colheita da cana-planta (outubro/2014), tendo sido o mesmo seguido para a socaria seguinte (outubro/2015). Todas as colheitas foram realizadas sem despalha a fogo, tendo-se obtido o peso total da biomassa aérea de cada parcela ao final de cada ciclo.

3.2 VARIÁVEIS AGROINDUSTRIAIS

Uma amostra de dez plantas foi retirada das três linhas centrais, pesadas inteiras e, posteriormente, separadas em folhas, colmos e ponteiros. As partes das plantas foram pesadas ainda úmidas e subamostras foram retiradas e secas em estufa de circulação forçada a 65°C até obter peso constante. As variáveis agroindustriais teor de fibra, pol do caldo extraído (PCE), brix, e açúcar total recuperável (ATR) foram obtidos conforme metodologia proposta pelo CONSECANA (2006) nas instalações da Usina Central Olho D'água S/A.

A determinação do brix foi feita em refratômetro digital, com resolução máxima de 0,1° Brix (um décimo de grau brix), sendo o valor final expresso a 20°C.

A pol do caldo extraído foi determinada em sacarímetro digital, calibrado a 20°C, em comprimento de onda de 587 e 589,4 nm, após clarificação do caldo com mistura clarificante à base de alumínio. A pol do caldo (teor de sacarose aparente por cento, em peso, de caldo) é calculada pela equação 2.

$$\text{Pol do caldo extraído} = \text{LPb} (0,2605 - 0,0009882 \times \text{B}) \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde: LPb é a leitura sacarimétrica equivalente a de subacetato de chumbo e B é o brix do caldo.

A fibra da cana (F) foi calculada pela equação 3.

$$\text{F} = 0,08 \times \text{PBU} + 0,876 \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde: PBU é o peso do bagaço úmido da prensa, em gramas.

O açúcar total recuperável (ATR) foi obtido após o conhecimento dos valores de pol da cana e açúcares redutores da cana de acordo com a equação 4.

$$\text{ATR} = 10 \times \text{PC} \times 1,05263 \times 0,905 + 10 \times \text{ARC} \times 0,905 \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde: (10 x PC) é o pol por tonelada de cana; 1,05263 é o coeficiente estequiométrico para a conversão da sacarose em açúcares redutores; 0,905 é o coeficiente de recuperação, para uma perda industrial de 9,5% e (10 x ARC) são açúcares redutores por tonelada de cana.

A produção de colmos foi quantificada por meio da pesagem dos colmos da área útil de cada parcela acrescida do peso dos dez colmos retirados por ocasião da amostragem. Dessa

forma, considerando esses resultados e a área útil de cada parcela, calculou-se a produtividade de colmos, expressa em Mg. ha⁻¹.

3.3 CARACTERIZAÇÃO LIGNOCELULÓSICA DA BIOMASSA

Para obtenção do bagaço a ser caracterizado quimicamente, utilizou-se parte dos colmos da amostragem aludida. Os colmos tiveram seu caldo extraído em moenda tipo engenho de cana com motor e rolos em aço inox e posterior moagem em moinho tipo Wiley, sendo recuperado o material que ficou retido na malha de 2 mm. A caracterização das amostras desse bagaço foi realizada de acordo com a metodologia de Van Soest (1963), para quantificação dos teores de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), carboidratos (celulose e hemicelulose) e lignina detergente ácido (LDA).

Tal caracterização ocorreu antes e após a etapa de pré-tratamento a fim de se ter conhecimento da mudança composicional do material pós-processo de pré-tratamento do material lignocelulósico.

3.4 ESTIMATIVAS DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO

A estimativa de etanol de primeira geração foi obtida por meio da equação 5 (FERNANDES, 2011).

$$\mathbf{Etanol (1G) = PCE \times 0,6821} \qquad \mathbf{Eq. (5)}$$

Sendo: Etanol (1G) a produtividade teórica de etanol de primeira geração em L. ha⁻¹, PCE a pol do caldo extraído que representa o teor de sacarose contido no caldo da cana em quilogramas por hectare e 0,6821 o fator de conversão estequiométrico de sacarose em etanol.

A produtividade de etanol de segunda geração foi estimada pela equação 6 (ZHAO et al., 2008).

$$\mathbf{Etanol (2G) = \frac{(celulose+hemicelulose) \times MS \times 1,11 \times 0,85 \times 0,51 \times 0,85}{0,79} \times 1000} \qquad \mathbf{Eq. (6)}$$

Onde: Etanol (2G) é a produtividade de etanol de segunda geração em L.ha⁻¹, celulose + hemicelulose são os teores percentuais dos carboidratos na matéria seca da cana, MS é produtividade de matéria seca por hectare em Mg. ha⁻¹, 1,11 o fator de conversão de açúcar a partir de celulose e hemicelulose, 0,51 o fator de conversão de etanol a partir do açúcar, 0,85 no primeiro caso trata-se da eficiência do processo para obtenção de açúcar a partir celulose e hemicelulose, tratando-se no segundo caso da eficiência do processo da obtenção de etanol a partir do açúcar e 0,79 é a densidade específica do etanol em g. mL⁻¹.

3.5 EFICIÊNCIA DOS PROCESSOS PARA ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Com base na caracterização lignocelulósica, e considerando que, comercialmente, de uma maneira geral, apenas o bagaço é utilizado com a finalidade de obter etanol de segunda geração, apenas este material da variedade mais promissora de acordo com os teores de fibra e estimativas de etanol de segunda geração foi submetida aos procedimentos descritos a seguir a fim de verificar a eficiência dos processos na obtenção do combustível.

3.5.1 Pré-tratamento

O bagaço da variedade que se mostrou mais promissora de acordo como os métodos anteriormente descritos foi submetido ao pré-tratamento em erlenmeyers de 500mL, com peróxido de hidrogênio alcalino (H₂O₂) nas seguintes condições: 10% (m/v) do substrato, 7,5 % H₂O₂ (m/v) e incubação por 1h, rotação de 0,094g à temperatura ambiente, registrada em 30°C no momento do ensaio. O pH da solução de H₂O₂ foi previamente ajustado para 11,5 utilizando-se solução de NaOH a 5M. Após o término da reação, a fração sólida foi recuperada por filtração e lavada com 500 mL de água destilada com o objetivo de remoção dos compostos residuais, especialmente a lignina. Após a lavagem o material pré-tratado foi seco em estufa a 65°C por 48h, conforme proposto por Dutra (2014). Nesta etapa foi possível determinar a perda de massa após o pré-tratamento de acordo com a equação 7.

$$PM (\%) = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad \text{Eq. (7)}$$

Onde PM: perda de massa (%); Mi: massa inicial do material lignocelulósico (g) e Mf: massa final do material lignocelulósico (g).

Foi possível ainda quantificar os açúcares perdidos durante o pré-tratamento pelo método do reagente ácido dinitro-3,5-salicílico (DNS), descrito por Miller (1959). O DNS permitiu quantificar os açúcares redutores liberados a partir da curva padrão de glicose (concentração de glicose versus absorvância a 540nm).

3.5.2 Preparo da curva padrão de glicose

Preparou-se, a partir de uma solução estoque de glicose 1,0 mg/mL, soluções de glicose de 0; 1,0; 1,65; 2,5; 3,35; 5,0 mg/mL, que após reações com DNS (método descrito a seguir), foram lidas no espectrofotômetro a 540nm. Com os dados obtidos traçou-se um gráfico linear da concentração de glicose (açúcar redutor) em função da absorvância, e assim, determinar uma equação que relaciona as duas grandezas.

3.5.3 Quantificação dos açúcares redutores pelo método DNS

As concentrações dos açúcares totais (AT) foram determinadas de acordo com o método do ácido dinitro-3,5-salicílico (DNS) (MILLER, 1959).

Adicionaram-se 0,5 mL das amostras a serem quantificadas em cada tubo de ensaio e 1 mL de DNS. Os tubos foram mantidos em um banho (marca TECNAL; modelo TE-056) a 95°C por 5 minutos para desenvolvimento da coloração avermelhada. Após este tempo reacional, as amostras foram resfriadas imediatamente pela imersão dos tubos em um banho de gelo fundente, adicionando em seguida 20 mL de água.

Os tubos foram agitados para homogeneizar a solução e as leituras da absorvância, efetuadas em espectrofotômetro (marca FEMTO; modelo 600s) a comprimento de onda em 540 nm. Para zerar o espectrofotômetro, preparou-se um tubo onde o volume da amostra foi substituído por água destilada, sendo chamado de tubo branco da reação.

A determinação da concentração dos AT em cada uma das amostras analisadas foi feita de acordo com a curva-padrão de glicose. Sempre que necessário, foram efetuadas diluições das amostras de modo que a absorvância resultante estivesse contida no intervalo da curva-padrão.

3.5.4 Determinação da atividade enzimática

A hidrólise enzimática foi conduzida utilizando enzima comercial Celluclast® 1,5L, gentilmente cedida pela LNF Latino América S/A. Sua atividade foi determinada como atividade de filtro de papel (FPA) e expressa em unidades de papel de filtro (FPU – *Filter Paper Units*) por volume de enzima original, como recomendado pela IUPAC (GHOSE, 1987; WOOD & BHAT, 1988; ADNEY & BAKER, 1996).

Para a determinação da atividade enzimática, partiu-se de uma solução de celulase de diluição de 1:20. De posse dessa solução, efetuaram-se cinco novas diluições de 0,12; 0,13; 0,20; 0,25 e 0,33 mg/mL em tampão citrato (0,05 mol/L pH 4,8). Em cada tubo de ensaio adicionou-se 1,0 mL de tampão citrato e em seguida, 50 mg de filtro de papel enrolado, tomando o devido cuidado para que este ficasse saturado pelo tampão. Os tubos foram colocados em um banho termostático a 50°C para que a temperatura se equilibrasse. Após 10 minutos, adicionaram-se 0,5 mL da enzima previamente diluídos em tampão citrato e os tubos foram encubados por exatamente 60 minutos.

Ao final deste período, os tubos foram removidos e a reação enzimática parada imediatamente com a adição de 1,5 mL do reagente DNS. Os tubos foram fervidos por 5 minutos a 95°C e posteriormente transferidos para um banho de gelo fundente. Ao final, adicionaram-se 20mL de água e os tubos foram invertidos para a homogeneização da solução. Quando a polpa de papel restante da reação de hidrólise foi assentada, a cor formada foi medida no espectrofotômetro a 540nm.

Para o preparo do tubo do branco reacional, adicionaram-se 1,5 mL do tampão citrato e após os 60 minutos de reação aplicou-se o método DNS como descrito anteriormente. Para o preparo dos tubos controle da enzima, adicionou-se 1,0 mL do tampão citrato e 0,5 mL de cada uma das diluições da enzima, que ao final do tempo reacional, tiveram suas reações paradas com a adição do DNS. O tubo controle do substrato foi preparado adicionando 1,5 mL do tampão citrato e 50 mg de filtro de papel enrolado, que ao final de 60 minutos, também foi analisado pelo método DNS.

De posse das leituras das absorbâncias, traçou-se uma reta relacionando o logaritmo da concentração da enzima em cada uma das diluições em função da massa de glicose liberada por 0,5 mL dessa enzima diluída, determinando assim a atividade enzimática da enzima comercial de acordo com a equação 8.

$$\text{FPU/mL} = \frac{2,0}{(0,18016 \times 0,5 \times 60 \times [\text{enzima diluída}])} \mu \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \quad \text{Eq. (8)}$$

Onde, para a referida enzima, uma unidade da atividade (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente, isto é, 2,0/0,18016 μmol de 50 mg de papel filtro por 0,5 mL de enzima diluída em 60 minutos de reação (GHOSE, 1987).

3.5.5 Hidrólise enzimática

Foi utilizado nesta etapa um delineamento experimental 2² com triplicata no ponto central, conforme desenho esquemático apresentado na tabela 3.

A hidrólise enzimática foi conduzida utilizando enzima comercial Celluclast® 1,5L, gentilmente cedida pela LNF Latino América S/A. O material pré-tratado foi suspenso em tampão citrato de sódio a 0,05 M e pH 4,8 para as cargas de sólidos (%m/v) de 5 e 10% e tratado sob agitação de 0,094g à 50°C, por 48h, com a enzima comercial nas proporções de 5 e 10 FPU. g⁻¹ de biomassa seca. As hidrólises foram conduzidas em erlenmeyers com volume de 125 mL. Após o término do tempo da ação enzimática os hidrolisados foram aquecidas a 76°C para desnaturação das enzimas e centrifugados a 0,226g durante 10 minutos, com a finalidade de coleta do líquido sobrenadante, que foi recolhido e congelado (0°C) para posteriores análises dos teores de açúcares.

Tabela 3: Condições experimentais para a hidrólise enzimática

Erlenmeyers	Carga enzimática (FPU/g)	Carga de sólidos (%m/v)
1	5	5
2	10	5
3	5	10
4	10	10
5	7,5	7,5
6	7,5	7,5
7	7,5	7,5

3.5.6 Quantificação dos açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência

Os açúcares glicose, celobiose e xilose presentes no hidrolisado enzimático obtido tiveram seus teores determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Amostras de 2 mL foram filtradas em um cartucho poros de 0,22µm da marca Whatman acoplados a uma seringa. As amostras filtradas foram injetadas em uma coluna Hi-plex do tipo exclusão molecular e modelo “PL Hi-Plex H 8µm (Agilent Technologies)” utilizando como fase móvel água (100%), com vazão de 0,6 ml/min. A temperatura do forno foi de 35°C e o tempo de corrida de 15 minutos, para um volume de injeção de 20 µL. As concentrações dos açúcares foram obtidas pela correlação entre as áreas dos cromatogramas e suas respectivas curvas- padrão. As curvas-padrão foram previamente determinadas com amostras de concentrações conhecidas de D-glicose e D-(+) celobiose.

Com a determinação dos açúcares foi calculada a eficiência da hidrólise enzimática em relação à conversão de celulose em glicose + celobiose, conforme a equação 9.

$$EH (\%) = \frac{C1+C2}{w \times f \times 1,11} \times 100 \quad \text{Eq. (9)}$$

Onde, EH é a eficiência de hidrólise enzimática; C1 a concentração de glicose no hidrolisado (g); C2 a concentração de celobiose no hidrolisado (g); w a concentração de substrato (g); f o teor de celulose no material pré-tratado; e 1,11 é o fator de conversão de celulose em glicose.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados das diferentes adubações e das cinco variedades foram à análise de variância (ANOVA) em arranjo fatorial, considerando-se como fator “A” as variedades RB92579 (A1), RB867515 (A2), RB863129 (A3), RB962962 (A4) e RB931011 (A5) e como fator “B” as adubações 0 (B1), 40 (B2) e 80 kg.ha⁻¹ de N (B3) . As análises foram realizadas separadamente para cada um dos dois ciclos de cultivo, exceto para os dados referente a etanol de segunda geração e caracterização lignocelulósica, onde, mesmo seguindo-se o mesmo arranjo não foi possível a amostragem para a primeira soca (2014), que foram avaliados apenas para o ciclo de cultivo de 2015 (2ª soca).

Foi utilizado o *software* ASSISTAT (SILVA E AZEVEDO, 2006) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a nível de significância de $p \leq 0,05$. Os resultados da hidrólise enzimática foram analisados em arranjo experimental com planejamento fatorial 2² com triplicata no ponto central por meio do *software* STATISTICA versão 7.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUTIVIDADE DE CANA-DE-AÇÚCAR

Tabela 4: Produtividade de cinco variedades de cana-de-açúcar, em três níveis de adubação nitrogenada, nas duas primeiras socarias (2014 e 2015), em experimento de campo, em Itambé, PE.

1ª Soca				
	0 kg N.ha⁻¹	40 kg N.ha⁻¹	80 kg N.ha⁻¹	Média (Variedades)
	----- Mg . ha ⁻¹ -----			
RB92579	105,83	110,83	95,83	104,16 a*
RB867515	99,17	111,67	106,67	105,83 a
RB863129	105,42	92,50	99,17	99,02 a
RB962962	111,25	117,08	96,25	108,19 a
BR931011	90,00	101,25	96,67	95,97 a
Média (Adubações)	102,33 A	106,66 A	98,91 A	
				Teste F
Variedades (V)				2,33 ^{ns}
Adubação (A)				2,32 ^{ns}
Interação (V x A)				1,63 ^{ns}
Média Geral				102,64
CV (%)				11,10
2ª Soca				
	0 kg N.ha⁻¹	40 kg N.ha⁻¹	80 kg N.ha⁻¹	Média (Variedades)
	----- Mg . ha ⁻¹ -----			
RB92579	65,18	63,21	69,12	65,83 a
RB867515	63,04	75,71	74,29	71,01 a
RB863129	63,21	67,14	71,79	67,38 a
RB962962	71,43	70,54	70,54	70,83 a
BR931011	57,50	66,96	73,75	66,07 a
Média (Adubações)	64,07 B	68,71 AB	71,89 A	
				Teste F
Variedades (V)				1,36 ^{ns}
Adubação (A)				5,47**
Interação (V x A)				1,15 ^{ns}
Média Geral				68,23
CV (%)				11,03

*Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey. ($p \leq 0,05$). ** Significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$). ns Não significativo.

Em relação à produtividade de colmos, as interações para ambas as socas não foram significativas entre os fatores variedades e adubação. Sendo assim, o comportamento das variedades, com relação à produtividade, independeu do nível de adubação nitrogenada. Na

segunda soca, o fator adubação foi significativo, e a produção de colmos das variedades foi maior quando adubadas com 80 Kg.ha^{-1} de N. Isso indica que deve haver adubação nitrogenada na segunda soca para aumento da produtividade de colmos, fato facilmente associado à diminuição das reservas de N no solo ao longo dos ciclos de cultivo (CHAPMAN et al., 1983).

Orlando Filho et al. (1999) constataram que a resposta da cana-planta ao N se refletiu no maior vigor das soqueiras, aumentando a produção nos cortes subsequentes. Alvarez et al. (1963) verificaram que a adubação nitrogenada em cobertura de cana-soca com a aplicação de 75 kg. ha^{-1} de N, proporcionou 10% de aumento na produção da cana-de-açúcar comparado à testemunha.

Entretanto, outros trabalhos (ANJOS et al., 1998; OLIVEIRA et al., 1998) não indicaram efeitos expressivos do nitrogênio no rendimento da soqueira de cana-de-açúcar. Oiticica et al. (1999) observaram ausência de resposta na produção da cana-de-açúcar com a aplicação de nitrogênio (até 60 Kg.ha^{-1}) em um Argissolo Vermelho-Amarelo de acordo com o que se observa no presente trabalho, em função da não significância da interação entre os fatores estudados em ambas as socas.

4.2 VARIÁVEIS AGROINDUSTRIAIS

O Pol do caldo extraído (PCE) para a interação dos não diferiu significativamente em ambas as socas, fato também observado para Brix e Açúcar Total Recuperável (ATR) na segunda soca (Tabela 5). Deve-se atentar ao fato de que o coeficiente de variação foi abaixo de 10% em todos os casos, sendo considerado como baixo por GOMES (1970), o que indica bom controle sobre as variações do acaso.

Os valores de brix (Tabela 6) variaram de 16,2% a 24,6%, estando a maioria das médias acima do valor de 18% considerado por Marques et al. (2001) como o valor mínimo necessário para que a cana apresente condições de ser amostrada para uma análise detalhada das variáveis tecnológicas, indicando que a sua colheita ocorreu no período correto, sem comprometer a quantidade de açúcares presentes na sua estrutura e, conseqüentemente, sua qualidade tecnológica.

Tabela 5: Resumo da análise de variância (Teste F e significância) para as variáveis Brix, fibra, PCE e ATR, em arranjo fatorial entre as variedades e adubações para dois ciclos de cultivo em Itambé-PE.

	GL	Brix		Fibra		PCE		ATR	
		1ª soca	2ª soca						
Variedades (V)	4	5,15**	9,76**	0,38 ^{ns}	4,35**	3,97**	8,55**	4,48**	10,43**
Adubação (A)	2	0,01*	1,84 ^{ns}	2,07 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,41 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,59 ^{ns}
Interação (V x A)	8	2,98**	1,62 ^{ns}	3,30**	2,79*	2,12 ^{ns}	1,99 ^{ns}	2,22*	1,82 ^{ns}
Tratamentos	14	1,17**	3,97**	2,29*	2,89**	2,40*	3,64**	2,55**	4,10**
Blocos	3	0,44 ^{ns}	0,60 ^{ns}	0,54 ^{ns}	2,21 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,70 ^{ns}	0,15 ^{ns}	1,09 ^{ns}
CV(%)		5,70	4,65	4,61	5,61	8,38	8,40	6,33	6,08

** Sifgnificativo ao nível de 1% de propabilidade ($p < 0,01$). * Sifgnificativo ao nível de 5% de propabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$). ns Não significativo ($p \geq 0,05$).

Tabela 6: Variáveis agroindustriais (Brix, fibra, PCE e ATR) para cinco variedades de cana-de-açúcar e três níveis de adubação nitrogenada nas duas primeiras socarias (2014 e 2015) em experimento de campo, em Itambé, PE.

	Brix				Fibra			
	1ª SOCA				2ª SOCA			
	N0	N40	N80	Médias	N0	N40	N80	Médias
	°Brix				%			
RB92579	18,70 aA*	17,90 aA	18,52 aA	18,37 a	13,77 aA	13,58 aA	14,58 abA	13,98 a
RB867515	18,85 aA	19,00 aA	18,95 aA	18,93 a	14,07 aA	13,67 aA	13,82 abA	13,85 a
RB863129	19,02 aA	17,82 aA	18,50 aA	18,45 a	14,29 aA	13,60 aA	13,34 bA	13,74 a
RB962962	17,87 abA	17,30 aA	16,25 bA	17,14 b	13,02 aB	14,20 aA	13,88 abAB	13,70 a
BR931011	16,27 bB	18,87 aA	18,50 aA	17,88 ab	13,10 aB	13,95 aAB	14,66 aA	13,90 a
Médias	18,14 A	18,18 A	18,14 A		13,65 A	13,80 A	14,06 A	
	1ª SOCA				2ª SOCA			
	N0	N40	N80	Médias	N0	N40	N80	Médias
	°Brix				%			
RB92579	23,75	24,62	22,82	23,73 a	14,07 aA**	13,92 abA	13,51 abA	13,83 ab
RB867515	22,37	22,95	23,82	23,05 ab	13,64 aA	13,34 bA	14,67 aA	13,88 ab
RB863129	22,20	21,85	22,20	22,08 bc	14,44 aA	13,46 bAB	12,61 bB	13,50 b
RB962962	21,45	22,32	20,50	21,42 c	14,09 aA	15,14 aA	14,48 aA	14,57 a
BR931011	23,27	23,72	23,10	23,36 a	14,29 aA	14,97 abA	14,47 aA	14,56 a
Médias	22,61 A	23,09 A	22,49 A		14,11 A	14,16 A	13,95 A	

*Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para cada uma das socas dentro de cada variável. **Letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade para cada uma das socas dentro de cada variável. Médias não seguidas por letras apresentaram interação não significativa de acordo com a análise de variância.

Tabela 6 (continuação): Variáveis agroindustriais (Brix, fibra, PCE e ATR) para cinco variedades de cana-de-açúcar e três níveis de adubação nitrogenada nas duas primeiras socarias (2014 e 2015) em experimento de campo, em Itambé, PE.

	PCE				ATR			
	1ª SOCA							
	N0	N40	N80	Médias	N0	N40	N80	Médias
	%				Kg.Mg ⁻¹			
RB92579	16,23	15,97	17,11	16,44 a	131,01 abA	127,56 aA	131,32 aA	129,96 a
RB867515	16,70	16,15	16,71	16,52 a	132,58 aA	131,99 aA	133,51 aA	132,69 a
RB863129	16,34	15,17	16,19	15,91 ab	131,31 abA	124,66 aA	131,28 aA	129,08 ab
RB962962	15,76	14,57	13,68	14,67 b	127,77 abA	119,22 aAB	113,14 bB	120,04 b
BR931011	13,86	16,28	16,28	15,47 ab	115,49 bB	131,36 aA	128,32 abAB	125,05 ab
Médias	15,78 A	15,63 A	16,00 A		127,63 A	126,96 A	127,51 A	
	2ª SOCA							
	N0	N40	N80	Médias	N0	N40	N80	Médias
	%				Kg.Mg ⁻¹			
RB92579	20,64	22,12	19,72	20,83 a	163,94	173,44	159,07	165,49 a
RB867515	18,72	18,74	20,94	19,47 ab	153,17	155,39	163,75	157,44 ab
RB863129	18,06	17,88	19,60	18,51 bc	147,56	148,23	158,95	151,58 bc
RB962962	17,54	18,49	16,06	17,36 c	144,09	148,04	134,42	142,18 c
BR931011	20,17	20,23	20,05	20,15 ab	159,89	159,57	158,30	159,25 ab
Médias	19,03 A	19,49 A	19,48 A		153,73 A	156,93 A	154,90 A	

*Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para cada uma das socas dentro de cada variável. **Letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade para cada uma das socas dentro de cada variável. Médias não seguidas por letras apresentaram interação não significativa de acordo com a análise de variância.

Apenas a variedade RB931011, quando não adubada, apresentou teor de brix inferior às demais. Todas as outras variedades não diferiram significativamente para as diferentes adubações. Com isso, de maneira geral, os dados corroboram os resultados obtidos por Marques (1996), nas quais o acréscimo da quantidade de N na forma de lodo de esgoto não afetou os teores de brix, não se tendo observado alterações significativas em relação ao tratamento testemunha. Todavia, outros trabalhos (FRANCO et al., 2008; MEGDA et al., 2012) mostram redução nos teores de sólidos solúveis em função da adubação, como foi o caso do estudo realizado por Rhein et al. (2016), com redução quando utilizadas doses superiores a 100 Kg. ha⁻¹ de N.

Com relação aos teores de fibra (tabela 8), as variedades RB92579, RB867515 e RB863129 não apresentaram alterações significativas em função da adubação na primeira soca, verificando-se o mesmo para todas as variedades, com exceção da RB863129, na segunda soca. As variedades apresentaram comportamento similar, não diferindo entre si quanto aos teores de fibra quando não adubadas, em ambas as socarias, e quando adubadas com 40 Kg.ha⁻¹ de N na primeira soca. Quando adubadas (40 e 80 Kg. ha⁻¹ de N), as variedades RB962962 e RB931011 apresentaram teores de fibra superiores às demais assim como a variedade RB867515 com adubação de 80 Kg.ha⁻¹ de N na segunda soca.

Vale (2009), não encontrou diferenças significativas para os teores de fibra em diferentes doses de adubação nitrogenada, fato corroborado por Rhein et al (2016). Meade (1963) estipulou o intervalo 11 - 16%, como o ideal para teores de fibra para a cultura da cana-de-açúcar. Como os valores variaram de 13% a 15%, os resultados atendem às expectativas de acordo com este autor.

Os valores médios das variedades cultivadas no Brasil correspondem a 12,5%, de acordo com Marques (2007) e a 12,0%, segundo Ripoli e Ripoli (2004). Os valores observados encontram-se acima da média nacional pelo fato das variedades serem adaptadas ao meio de cultivo da Zona da Mata pernambucana, onde as condições edafoclimáticas, principalmente de alta evapotranspiração, tornam necessários maiores teores de fibra. Amaral e Tavares (2013), comparando a quantidade de fibra de variedades utilizadas em São Paulo e em condições semiáridas (sertão pernambucano/baiano), encontraram valores 39,5% superiores nas condições semiáridas.

Outro fator importante a ser considerado para esta variável é o conceito de “cana-fibra”, em que há uma tendência para que tais teores sejam aumentados via melhoramento, atentando-se ao fato de aproveitamento da biomassa lignocelulósica para fins energéticos. Este maior teor de fibra observado nos resultados até então percebido como desvantajoso já

que diminui o teor de sacarose, pode na verdade constituir vantagem competitiva quando se trata do aproveitamento deste material para fins energéticos.

A produção de sacarose presente no caldo extraído (PCE) variou de 13% a 22% (Tabela 6: continuação). De acordo com Ferreira (2013), a pol do caldo extraído deve ser superior a 15%, sendo um indicativo do início da época do corte de variedades de cana-de-açúcar; enquanto Para Ripoli e Ripoli (2004), deve ser superior a 14%, já para Deuber (1988), o teor mínimo deve ser de 13%. As variedades apresentaram valores superiores a 15%, na maioria dos casos, com exceção das variedades BR931011 quando não adubada (13,86%) e RB962962, adubadas com 40 e 80 kg N.ha⁻¹ (14,58% e 13,69%, respectivamente), sendo assim, todas as variedades nos diferentes níveis de adubação nitrogenada satisfizeram esta condição.

Malavolta (2006) relatou que o uso de fertilizantes nitrogenados em cana-de-açúcar promove menor armazenamento de açúcar visto que os esqueletos carbônicos são consumidos para vegetar mais. Silveira e Crocomo (1990) observaram decréscimos no teor de sacarose em plantas que se desenvolveram com a aplicação de altas doses de N, diferindo dos resultados obtidos por Vale (2009), nas quais mesmo com o aumento da dose para 200 Kg. ha⁻¹ de N a quantidade de sacarose do caldo permaneceu inalterada quando comparada à dose testemunha.

De acordo com Stupiello et al. (1977) e Sobral et al. (1981), áreas fertilizadas e com aumento de matéria orgânica podem ter atraso no processo de maturação da cana. Segundo Tasso Júnior et al. (2007), a qualidade tecnológica do caldo varia de forma inversamente proporcional aos índices de precipitação pluviométricos, ou seja, nos períodos de menor índice pluviométrico ocorrem os maiores acúmulos de sacarose no caldo, como ocorre no local do experimento durante a época de colheita.

O açúcar total recuperável (ATR) representa todos os açúcares da cana, na forma de açúcares invertidos, embora outras substâncias redutoras, possam estar incluídas. Na planta, o desdobramento da sacarose em glicose e frutose é uma reação de inversão, assim como a combinação, durante o metabolismo da fotossíntese e respiração da planta; daí a importância do conhecimento do teor de ATR, para avaliação da qualidade da matéria-prima (FERNANDES, 2011). O ATR agrega valor ao produto colhido, sendo o padrão para Pernambuco de 119 kg .t⁻¹, baseado na convenção dos órgãos de classe do setor sucroalcooleiro (SIMÕES NETO et al., 2012).

Os valores de ATR expressam o potencial da indústria em recuperar o açúcar contido na cana, na forma de açúcar cristal ou de etanol. Observam-se valores médios que variam de

115,49 a 173,44 kg. t⁻¹ (Tabela 6: continuação). Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Carvalho (2014), para o mesmo grupo de variedades tendo encontrado valores entre 107,04 e 149,63 kg.t⁻¹, com adubações de 0, 12 e 40 kg N ha⁻¹, para cana-planta.

As variedades RB92579, RB867515 e RB863129 não tiveram seus valores de ATR alterados na primeira soca em função da adubação. Na segunda soca não se observam diferenças significativas para nenhuma das variedades nas diferentes adubações, o que vai de encontro aos resultados obtidos por Vale (2009), nos quais a variação das doses de N não alterou o ATR, o que não se observou em estudo realizado por Rhein et al. (2016), no qual doses acima de 100 kg.ha⁻¹ de N foram responsáveis por diminuição nos valores desta variável. Alguns autores (MUCHOW et al., 1996; FRANCO et al., 2008) afirmam que doses superiores a 100 kg.ha⁻¹ de N promovem significativas reduções no ATR, comprometendo a rentabilidade do sistema de pagamento. Como no presente trabalho não foram utilizadas doses de adubação nitrogenada desta magnitude, na grande maioria dos casos não houve variação dos valores de ATR.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

As interações não foram significativas entres os fatores variedades e adubação para todos os componentes da parede celular no bagaço da cana-de-açúcar. Para os teores de celulose e hemicelulose o fator variedades foi significativo (Tabela 7) tendo o bagaço variedade RB962962 apresentado maiores percentuais destes componentes.

Para bagaço, a literatura cita que devem ocorrer teores de celulose entre 32 e 48% (GOMEZ et al., 2010), superiores aos do presente trabalho, estão entre 23,9 e 30,8%. Santos et al. (2012) encontraram teores de hemicelulose variando de 19 a 24%. Portanto, os valores observados estão de acordo com o que foi proposto em literatura. Os teores de LDA encontram-se muito inferiores aos já mencionados por outros autores. Fengel et al. (1989) descreveram valores variando entre 20 e 30%.

No presente estudo ocorrem valores discordantes aos mencionados em literatura. Tal fato pode ser justificado pelo método de caracterização em questão (VAN SOEST, 1963) ser comumente utilizado para avaliação da digestibilidade de alimentos para ruminantes domésticos (SALMAN et al., 2010) discriminando entre teores de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) e LDA.

Tabela 7: Teores (%) de celulose, hemicelulose e LDA no bagaço de variedades de cana-de-açúcar cultivadas com (N40) e sem (N0) adubação nitrogenada em cana-soca.

Celulose			
	N0	N40	Médias
	----- % -----		
RB92579	25,05	25,81	25,43 b
RB867515	23,94	28,83	26,38 ab
RB863129	28,71	26,49	27,60 ab
RB962962	30,87	30,03	30,45 a
BR931011	27,95	25,59	26,77 ab
Médias	27,30 A	27,35 A	
			Teste F
Variedades (V)			2,73*
Partes da planta (PP)			0,002 ^{ns}
Interação (V x PP)			1,67 ^{ns}
CV (%)			11,97
Hemicelulose			
	N0	N40	Médias
	----- % -----		
RB92579	19,22	19,45	19,34 b
RB867515	20,92	21,22	21,07 ab
RB863129	22,78	21,94	22,36 ab
RB962962	24,01	23,71	23,86 a
BR931011	21,43	22,69	21,85 ab
Médias	21,67 A	21,72 A	
			Teste F
Variedades (V)			3,36*
Partes da planta (PP)			0,003 ^{ns}
Interação (V x PP)			0,12 ^{ns}
CV (%)			11,84
LDA			
	N0	N40	Médias
	----- % -----		
RB92579	6,70	6,04	6,37 a
RB867515	7,06	7,78	7,42 a
RB863129	6,85	7,15	7,01 a
RB962962	8,60	8,30	8,45 a
BR931011	7,82	7,43	7,63 a
Médias	7,41 A	7,34 A	
			Teste F
Variedades (V)			2,58 ^{ns}
Partes da planta (PP)			0,02 ^{ns}
Interação (V x PP)			0,34 ^{ns}
CV (%)			18,34

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns: não significativo ($p \geq 0,05$). Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A FDN inclui celulose, hemicelulose e lignina e a FDA inclui celulose e lignina como componentes primários, após as lavagens com os respectivos detergentes, além de

quantidades variáveis de cinzas e compostos azotados. (SANTOS et al., 2014). Os componentes da parede celular são então determinados por diferença entre esses teores, o que pode vir a caracterizar o método como indireto quando da discriminação entre celulose, hemicelulose e lignina. Outros inconvenientes do método utilizado é mensurar cutina como sendo lignina (GOERING E VAN SOEST, 1970); amostras de LDA podem estar contaminadas com artefatos de Maillard (JOHNSON, 1963); parte da lignina é potencialmente solúvel na solução de ácido sulfúrico a 72% (IIYAMA E WALLIS, 1990; HATFIELD et al., 1994) e assume-se ainda que os componentes possam ser subestimados em função da migração destes para outros compartimentos em função da possível não seletividade dos detergentes, como é o caso dos teores de hemicelulose mais elevados em detrimento da diminuição dos valores para LDA.

4.4 ESTIMATIVAS DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO

Por meio dos parâmetros tecnológicos da cana foi possível, com base em valores estequiométricos, fazer uma estimativa de produtividade de etanol de primeira geração. Convertendo-se os valores de PCE apresentados em porcentagem para quilogramas de acordo com a produtividade, multiplicando tais resultados pelo coeficiente estequiométrico proposto por Fernandes (2011), têm-se os resultados estimados de produtividade de etanol de primeira geração em L. ha⁻¹ (Tabela 8)

Na primeira soca, a interação entre os fatores variedades e adubação foi significativa, não tendo ocorrido diferença entre as variedades quando adubadas com 40 Kg. ha⁻¹ de N, e nem entre os níveis de adubação para as variedades RB92579, RB867515 e RB863129. Na segunda soca, a interação não foi significativa, e, de maneira geral, para o conjunto de variedades a adubação de 80 Kg. ha⁻¹ de N apresentou melhor desempenho (9458 L.ha⁻¹). Tal resultado é justificado pelo fato de que, na cana-soca, o potencial de resposta à fertilização com N é superior, devendo a adubação nitrogenada ser mais frequente e em doses mais elevadas que as da cana-planta (MEGDA et al., 2012).

Tabela 8: Produtividade de etanol de primeira geração nas duas primeiras socarias (2014 e 2015) de cinco variedades de cana-de-açúcar, com três níveis de adubação nitrogenada, em experimento de campo, em Itambé, PE.

1ª Soca			
	N0	N40	N80
	-----L . ha ⁻¹ -----		
RB92579	11699,98 aA	12076,64 Aa	11097,49 abA
RB867515	11319,01 abA	12311,76 Aa	12191,21 aA
RB863129	11718,33 aA	9693,06 Aa	11016,42 abA
RB962962	11979,04 aA	11618,96 Aa	8932,39 bB
BR931011	8445,41 bB	11229,07 Aa	10736,47 abAB
			QM
Variedades (V)			6166663,90*
Adubação (A)			1769420,43 ^{ns}
Interação (V x A)			6130938,26*
			MG
			11071,02
			CV (%)
			13,43
2ª Soca			
	N0	N40	N80
	-----L . ha ⁻¹ -----		
RB92579	9207,53	9523,85	9886,45
RB867515	8018,21	9717,79	10620,23
RB863129	7836,28	8190,47	9597,38
RB962962	8533,29	8949,14	7738,70
BR931011	7926,41	9204,36	10048,02
Média (Adubações)	8304,35 B	9117,13 AB	9458,16 A
			QM
Variedades (V)			2630742,04 ^{ns}
Adubação (A)			7027298,87*
Interação (V x A)			2402840,33 ^{ns}
			MG
			8959,87
			CV (%)
			14,57

*Sifgnificativo ao nível de 5% de propabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns: não significativo ($p \geq 0,05$). Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Os valores de produtividade de etanol obtidos variaram de 7738,70 a 12311,76 L. ha⁻¹. Vale (2009) obteve valores de 9450 a 15730 L. ha⁻¹, não observando variações entre diferentes doses de adubação nitrogenada, conforme ocorreu na segunda soca neste trabalho. Outros autores (AZEREDO, 2002; SILVA, 2003) obtiveram produtividades da ordem de 10000 L. ha⁻¹ e Carvalho et al. (2009), aplicando 112 Kg. ha⁻¹ de N obtiveram 9800 L. ha⁻¹ de etanol. Em contrapartida Santos et al. (2012), consideram que em termos médios gerais um hectare de cana-de-açúcar seja responsável por produzir em torno de 7000 L do combustível. A divergência entre os autores ocorre possivelmente pelas diferenças entre ambientes de cultivo, variedades e condições de manejo.

Com relação a produtividade de etanol de segunda geração, a variedade RB962962 apresenta melhores resultados em relação às demais. Em média seriam produzidos 13094 L. ha⁻¹ de etanol de segunda geração proveniente do bagaço para as condições estudadas (Tabela 9).

Tabela 9: Produtividade de etanol de segunda geração a partir do bagaço de variedades de cana-de-açúcar com (N40) e sem (N0) adubação nitrogenada na cana-soca.

	N0	N40	Médias
	L. ha ⁻¹		
RB92579	8585,76 cA	8427,28 bA	8506,52 c
RB867515	7327,00 cA	8794,45 bA	8060,73 c
RB863129	6974,73 cB	9630,72 abA	8302,74 c
RB962962	14781,24 aA	11408,60 aB	13094,92 a
BR931011	11003,95 bA	9573,15 abA	10288,55 b
Médias	9734,54 A	9566,84 A	
		Teste F	
Variedades (V)		28,08**	
Partes da planta (PP)		0,22ns	
Interação (V x PP)		8,82**	
CV (%)		11,71	

** Sifnificativo ao nível de 1% de propabilidade ($p < 0,01$); **ns**: não significativo ($p \geq 0,05$). Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Santos et al. (2012) consideraram que é possível produzir cerca de 3500 L. ha⁻¹ de etanol celulósico, considerando que apenas a celulose seja convertida em açúcares fermentescíveis. A equação proposta por Zhao et al. (2008), utilizada neste trabalho, estima que o etanol é produzido a partir dos açúcares provenientes das frações celulose e hemicelulose do material lignocelulósico, além de considerar eficiências de conversão dos açúcares e de etanol de 85% cada, o que não é observado na prática.

A escolha do bagaço para as caracterizações deu-se, pois, a nível industrial, quando se planeja obter etanol celulósico, as empresas optam pelo bagaço por ser o principal resíduo do setor sucroenergético, e ter um baixo teor de cinzas, oferecendo maiores vantagens em processos de bioconversão se comparado à palhada (PANDEY et al., 2000). Além do que estudos que permitam decidir entre manutenção ou remoção do material remanescente da colheita e em quais proporções não estão suficientemente maduros (SEABRA, 2008), podendo comprometer a viabilidade do processo de produção do combustível.

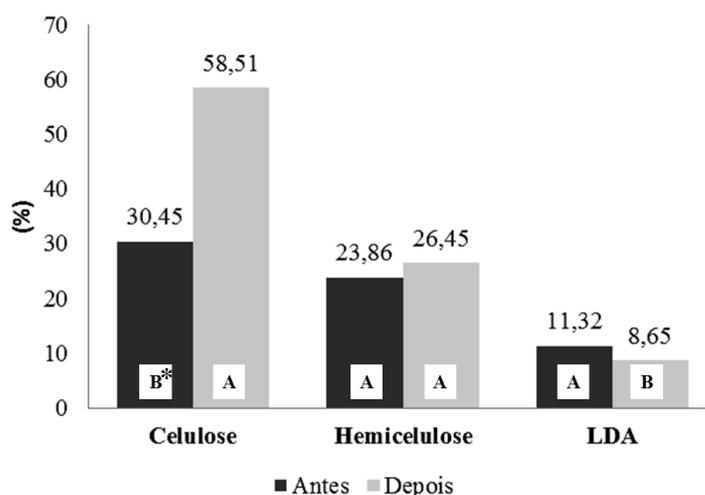
4.5 EFICIÊNCIA DOS PROCESSOS PARA ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

4.5.1 Pré-tratamento

Em função dos resultados previamente observados, o bagaço da variedade RB962962 foi considerado para as análises subsequentes. A perda de massa durante o processo de pré-tratamento, foi de 40,4% ($\pm 1,88$; $n=5$). Dutra (2014) estudou a eficiência do pré-tratamento com H_2O_2 alcalino e obteve uma perda de massa média de 35,8%, para o bagaço de cana-de-açúcar, não muito distante do valor observado no presente estudo. O pré-tratamento é um processo de deslignificação da biomassa que permite alcançar maior eficiência na recuperação de açúcares na etapa de hidrólise enzimática, estando a perda de massa relacionada com a solubilização de parte da lignina, extrativos, cinzas e pequenas frações de carboidratos para a fase líquida da reação (KARAGOZ et al., 2012).

Comparando-se os teores de celulose do bagaço da variedade RB962962 antes e depois do pré-tratamento observa-se considerável aumento em detrimento da redução dos teores de LDA (Figura 7) em virtude da remoção de parte da lignina do complexo lignocelulósico para o meio líquido, disponibilizando a parte fermentescível do material (celulose e hemicelulose) antes pouco disponível na microfibrila celulósica em função do alto grau de recalcitrância de seus componentes (SANTOS et al., 2012).

Figura 7: Composição lignocelulósica do bagaço da variedade de cana-de-açúcar RB962962, antes e depois do pré-tratamento com H_2O_2 alcalino.



*Letras maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Houve aumento de 47,9% nos teores de celulose e redução de 23,6% nos teores de LDA. Dutra (2014) obteve incremento de 30,4% nos teores de celulose e 40,3% de redução de

LDA, e Reis et al. (2016) aumento de 37,9% de celulose e redução de 44,3% nos teores de LDA, após pré-tratamento, também utilizando H₂O₂ alcalino.

As diferenças composicionais antes e depois do pré-tratamento ocorrem, pela solubilização e até mesmo hidrólise parcial dos carboidratos durante o processo de pré-tratamento, sendo a lignina redistribuída e até certo ponto removida do material pré-tratado (PAN et al., 2005). No presente trabalho, houve perda média 4,25 g. L⁻¹ ($\pm 0,27$; n=5) de açúcares totais, evidenciando a existência de hidrólise parcial dos carboidratos, conforme proposto por Pan et al. (2005).

Segundo Fengel et al. (1989), o processo de deslignificação alcalina não é seletivo apenas para a lignina, podendo degradar também os carboidratos, incluindo a celulose. Neste caso, apesar do incremento nos teores de celulose, não é possível afirmar que não houve degradação desta por meio das análises efetuadas.

4.5.2 Atividade enzimática

De acordo com Ghose (1987), uma unidade da atividade (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente, isto é, 2,0/0,18016 μ mol de 50 mg de papel filtro por 0,5 mL de enzima diluída em 60 minutos de reação. A atividade encontrada para a enzima utilizada foi 2,92 FPU. mL⁻¹. Tal valor deve ser considerado baixíssimo quando comparados aos resultados obtidos por Dutra (2014), que utilizando o mesmo complexo enzimático comercial verificou uma atividade de 45 FPU.mL⁻¹. O valor encontrado para o presente estudo pode ser justificado pelos processos de purificação que tenham sido realizados ainda a nível industrial que possam vir ter causado diluições no complexo enzimático.

4.5.3 Hidrólise enzimática

O delineamento fatorial 2² com triplicata no ponto central não foi significativo para nenhuma das variáveis analisadas, além de apresentar baixo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,6$) e não ter os testes de F satisfeitos. Sendo assim o modelo não deve ser considerado para fins preditivos, não sendo apresentado no presente estudo.

Uma justificativa para a falta de ajuste do modelo e conseqüente não representatividade são as variações entre as eficiências de hidrólise das triplicatas (tabela 12), ocasionadas possivelmente, por erros experimentais.

Os açúcares totais (AT), teores de glicose e eficiências de hidrólise (EH) para as condições de estudo são apresentadas na tabela 10.

Tabela 10: Condições experimentais para a hidrólise enzimática, teores de glicose e eficiência de hidrólise (EH) para bagaço da variedade de cana-de-açúcar RB962962 pré-tratado com H₂O₂ alcalino.

Condições	Carga enzimática (FPU.g ⁻¹)	Carga de sólidos (%m/v)	Glicose (g.L ⁻¹)	EH (%)
1	5	5	11,32	34,84
2	10	5	4,21	24,07
3	5	10	13,13	35,12
4	10	10	2,68	6,07
5	7,5	7,5	3,32	8,66
6	7,5	7,5	3,58	11,91
7	7,5	7,5	4,98	21,57

A eficiência de hidrólise enzimática, relação entre os teores de glicose e celobiose liberados no hidrolisado em função da carga de sólidos, foi maior nas condições 1 e 3 (34,8 e 35,1%; respectivamente) com carga enzimática de 5 FPU.g⁻¹ de biomassa seca e de sólidos de 5 e 10%, respectivamente. Reis et al (2016) obtiveram eficiência de 84,3% tendo utilizado 20 FPU. g⁻¹ e uma carga de sólidos de 10%, um valor próximo do observado por Rabelo (2007) que obteve um rendimento de 84,1% quando a hidrólise foi realizada com 0.33% de sólidos e carga enzimática de 3,47 FPU/g bagaço de celulase, porém com complementação de β-glicosidase. Em contrapartida, Carly (2011) obteve eficiência de 21% quando utilizou 33 FPU. g⁻¹, porém tendo empregado NH₄OH como pré-tratamento. As baixas eficiências de hidrólise encontradas no presente estudo podem ser justificadas pelo teor de solubilização de LDA ser considerado baixo (23,6%), quando comparado, por exemplo, aos resultados obtidos por Reis et al. (2016), com reduções nos teores de lignina de 44,3%.

Nas condições 2 e 4, com 10 FPU.g⁻¹ de carga enzimática, a eficiência de hidrólise foi maior quando a carga de sólidos foi de 5%, o que é justificado por alguns trabalhos (RABELO, 2007; GARCIA, 2009) que atestaram que quanto mais baixa a carga de sólidos, maior será a eficiência de hidrólise.

O emprego de cargas enzimáticas consideradas baixas foi pautado na busca pela viabilidade econômica do processo de obtenção de etanol de segunda geração. Partindo-se de

menores quantidades de enzima utilizada, esperava-se encontrar rendimentos iguais aos já mencionados na literatura, o que não ocorreu.

O rendimento da hidrólise é governado por muitos fatores: tipo de prétratamento do substrato, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da biodegradação, termoestabilidade das enzimas, concentração e adsorção do substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, concentração de substrato no meio e taxa de agitação (RABELO, 2010). Conseqüentemente, é necessário otimizar as condições de hidrólise para conseguir o funcionamento satisfatório dos processos de sacarificação (VALLANDER e ERIKSSON,1985).

5. CONCLUSÕES

- As variedades apresentaram comportamento similar em relação produtividade de colmos não tendo seu desempenho afetado pelas diferentes doses de N utilizadas na primeira soca. Na segunda soca maiores produtividades foram obtidas quando utilizada a dose de 80 Kg. ha⁻¹ de N.
- Os teores de açúcares (Pol do caldo extraído) não foram afetados pelas doses de N.
- Maior produtividade de etanol de primeira geração foi obtida quando a dose de 80 Kg. ha⁻¹ de N foi aplicada, independentemente da variedade, na segunda soca.
- Os teores de celulose, hemicelulose e LDA não foram afetados pela adubação nitrogenada.
- A variedade RB962962 mostrou-se produziu mais etanol de segunda geração em função dos teores mais elevados de celulose e hemicelulose em sua biomassa.
- O emprego do H₂O₂ alcalino como pré-tratamento do material lignocelulósico garantiu o incremento de 48% nos teores de celulose e redução de 24% de LDA.
- As maiores eficiências de hidrólise encontradas (34,8% e 35,1%), foram obtidas com a menor carga enzimática utilizada (5 FPU.g⁻¹), independentemente, neste caso, da carga de sólidos empregada.

REFERÊNCIAS

ABRAMOVAY, R. **Biocombustíveis: A energia da controvérsia**. Editora SENAC. 2009.

ADNEY, B.; BAKER, J. **Chemical analysis and testing task** - Laboratory analytical procedure. LAP-006, 1996.

ALCARDE, A.R. Processamento da cana-de-açúcar. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa**. Brasília, DF. 2007.

ALVAREZ, R.; SEGALLA, A. L.; WUTKE, A. C. P. Adubação da cana-de-açúcar. VIII. Adubação mineral em solos Massapê-Salmourão (1957-58). **Bragantia**, v. 22, p. 657-675, 1963.

AMARAL, F.C.S.; TAVARES, S.R.L. **Diferença do teor de fibra da Cana-de-açúcar para fins energéticos motivada pelo bioma**. In: Documentos: Embrapa Solos, ISSN 1517-2627; v.159. 25p., 2013.

ANDRADE, S.A.C.; CASTRO, S.B. **Engenharia e tecnologia açucareira**. Departamento de Engenharia Química CTG – UFPE. 2006.

ANDRADE, E.T.; CARVALHO, S.R.G.; SOUZA, L.F. Programa do Proálcool e o etanol no Brasil. **Engevista**, v.11, n.2. p.127-136, 2009.

ANDREOLI, C.; SOUZA, S.P. Cana-de-açúcar: a melhor alternativa para conversão de energia solar e fóssil em etanol. **Economia & Energia**, v.59, p.27-33. 2007.

ANJOS, I. A.; ANDRADE, L. A. B.; FIGUEIREDO, P. A. M. **Avaliação do potencial industrial de duas variedades de cana-de-açúcar (cana-soca), sob diferentes doses de nitrogênio**. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, Resumos. Caxambu: SBCS, p. 87, 1998.

APAC – Agência Pernambucana de Águas e Climas. **Monitoramento Pluviométrico** Disponível em: <<http://www.apac.pe.gov.br/meteorologia/monitoramento-pluvio.php>> Acesso em janeiro, 2017.

ARAÚJO, C.K.C. **Avaliação da influência de surfactantes químico e biológico na hidrólise enzimática de casca de coco verde após pré-tratamento ácido/alcalino e com peróxido de hidrogênio alcalino.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2016.

ASSUMPCÃO, S. M. N. **Pré-tratamento químico combinado do bagaço da cana visando a produção de etanol de segunda geração.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal da Bahia. Salvador. 99p. 2015.

AZEREDO, H.M. **Resposta da cana-de-açúcar a níveis de irrigação e de adubação de cobertura nos tabuleiros costeiros da Paraíba.** Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande. 112p. 2002.

BANERJEE, G.; CAR, S.; LIU, T.; WILLIAMS, D. L.; MEZA, S. L.; WALTON, J. D. Scale-up and integration of alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis, and ethanolic fermentation, **Biotechnology and Bioengineering**, v.109, n. 4, p.922-931. 2012.

BASANTA, M.V. **Dinâmica do nitrogênio na cultura de cana-de-açúcar em diferentes sistemas de manejo de resíduos da colheita.** Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba. 82p. 2004.

BASTOS, V. D. **Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias.** Estudo Setorial, BNDES, 2007.

BHAT, M. K., BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**. n.15, p.583-620, 1997.

BORTOLAZZO, N.G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia

Agrícola). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba. 76 f. 2011.

BURR, G.O.; TAKAHASHI, D. Absorbition and distribution of nutrients in sugar cane. part I: Nitrogen. **Hawaiian Planters Record**, v.55, n.1, p.3-10, 1955.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, S.S.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v.44, p.48. 2010.

CARLY, C.M. **Hidrólise e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar em escala de bancada para a produção de etanol 2G**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 97p. 2011.

CARVALHO, C.M.; AZEREDO, H.M.; NETO, J.D.; FARIAS, C.H.; SILVA, C.T.S.; GOMES FILHO, R.R. Rendimento de açúcar e álcool da cana-de-açúcar submetida a diferentes níveis de irrigação. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v. 4, n.1, p. 72-77, 2009.

CARVALHO, J.L.N., BRAUNBECK, O. A., CHAGAS, M.F. **Implantação do plantio direto de cana-de-açúcar: base para sustentabilidade do canavial**. CNA, Brasil, 2012.

CARVALHO, E. X. **Ciclagem de nitrogênio e estimativa de biomassa de cana-de-açúcar em Pernambuco**. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares). Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 71p. 2014.

CESAR, M.A.A.; DELGADO, A.A.; CAMARGO, A.P. de; BISSOLI, B.M.A.; SILVA, F.C. **Capacidade de fosfatos naturais e artificiais em elevar o teor de fósforo no caldo de cana-de-açúcar (cana-planta), visando o processo industrial**. STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos, v.6, p.32-38. 1987.

CHAPMAN, L.S.; HOGARTH, D.M.; LEVERINGTON, K.C. **Does nitrogen fertilizer carry over to succeeding crops** In: Australian Society of Sugar Cane Technologists Congress, Proceedings. v. 22, p. 109-114, 1983.

CHIEPPE JUNIOR, J.B. **Tecnologia e fabricação do álcool**. Inhumas: IFG. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2012.

CIB - CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. **Guia da cana-de-açúcar: Avanço científico beneficia o País**. 2015. Disponível em: <www.cib.org.br/>. Acesso em: novembro, 2015.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. 2015. 19p. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/cana-de-açúcar>>. Acesso em: dezembro, 2015.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. 2016. 19p. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/cana-de-açúcar>>. Acesso em: dezembro, 2016.

CONSECANA - Conselho dos Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo. **Manual Consecana**. Edição 2006. Disponível em: <<http://www.orplana.com.br>>. Acesso em: dezembro, 2015.

DAWSON, L.; BOOPATHY, R. Cellulosic ethanol production from sugarcane bagasse without enzymatic saccharification. **BioResources**, v. 3, n.2, p.452-460. 2008.

DEUBER, R. **Maturação da cana-de-açúcar na região Sudeste do Brasil**. In: Anais-Seminário de Tecnologia Agronômica. Piracicaba: Copersucar. v.4. p.33-40, 1988.

DUTRA, E.D.; BARBOSA NETO, A.G.; SOUZA, R.B.; MORAIS JUNIOR, M.A.; TABOSA J.N.; MENEZES, R.S.C. Ethanol production from the stem juice of different sweet sorghum cultivars in the State of Pernambuco, Northeast of Brazil. **Sugar Tech**, v.15, n.3, p.316-321, 2014.

DUTRA, E.D. **Avaliação da produção de etanol de primeira e de segunda geração a partir da biomassa de sorgo sacarino**. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares). Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 127p., 2014.

ENCARNAÇÃO, C.R.F. **Observações meteorológicas e tipos climáticos das unidades e campos experimentais da empresa IPA**. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, 110p.,1980.

FENGEL, D.; WEGENER, G.; GREUNE, A. Studies on the delignification of spruce wood by organosolv pulping using SEM-EDXA and TEM. **Wood Science and Technology**, v. 23, n. 2, p. 123-130, 1989.

FERNANDES, A.C. **Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar**. Piracicaba: STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos, 193 p., 2000.

FERNANDES, A.C. **Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar**. 3ª Edição. Piracicaba: STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos, 416p., 2011.

FERREIRA, L. R. C.; LIRA JUNIOR, M.D.A.; ROCHA, M.S. Deposição e acúmulo de matéria seca e nutrientes em serapilheira em um bosque de sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* benth). **Revista Arvore**, v.31, n.1, p.7-12, 2007.

FERREIRA, C.A.S. **Intensidade de infestação de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepdóptera: Crambidae) na qualidade tecnológica de variedades de cana-de-açúcar, em Goiás**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Goiás. n.XV, 78p., 2013.

FRANCO, H.C.J.; BOLOGNA, I.R.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; TRIVELIN, P.C. Acúmulo de macronutrientes em cana-de-açúcar em função da aplicação de nitrogênio e dos resíduos culturais incorporados ao solo no plantio. **Bragantia**, v. 66, p. 669-674, 2008.

GALBE, M.; ZACCHI, G.A.; A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.59, n.6, p.618-628, 2011.

GAN, Q., ALLEN, S. J., TAYLOR, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling.

Process Biochemistry. n.38, p.1003-1018, 2003.

GARCIA, D. R. **Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior.**

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 98p. 2009.

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

GOERING, K.H.; VAN SOEST, P. J. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). **USDA Agriculture Handbook**, 1970.

GOMES, J.F.F. **Produção de colmos e exportação de macronutrientes primários por cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.).** Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 73f. 2003.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental.** 4.ed. Piracicaba: ESALQ-USP, 430p. 1970.

GÓMEZ, E. O.; ROCA, G.A.A.; CORTEZ, L. A. B.; ALMEIDA, E.; OLIVEIRA, B.R.; ROCHA, G.J.M. **Estudo experimental da classificação pneumática contínua de bagaço de cana-de-açúcar.** 8º Congresso sobre Geração Distribuída e Energia no Meio Rural. 2010.

GOULD, J.M.; FREER, S.N. High-efficiency ethanol production from lignocellulosic residues pretreated with alkaline H₂O₂. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p.628-631, 1984.

HATFIELD, R. D.; JUNG, H. G.; RALPH, J.; BUXTON, D. R.; WEIMER, P. J. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 65, p. 51-58, 1994.

HEIKINHEIMO, L. **Trichoderma reesei cellulases in processing of cotton**. Tese (Doutorado em Tecnologia). VTT Publications 483, Espoo, Finlândia. 2002.

IYAMA, K.; WALLIS, A.F.A. Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 51, n. 2, p. 145-161, 1990.

IPA – INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO. CAVALCANTI, F. J. de A. (Coordenador). **Recomendações de adubação para o estado de Pernambuco: 2ª Aproximação**. 2ª Edição revisada. Recife: IPA. 212p. il., 2008.

IRWIN, D. SPEZIO, M., WALKER, L., et al. Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism and binding domain efforts. **Biotechnology and Bioengineering**. v.41, p.1002-1013, 1993.

JOHNSON, R.R. Symposium on microbial digestion in ruminants: in vitro rumen fermentation techniques. **Journal of Animal Science**, v.22, p.792-800, 1963.

KARAGÖZ, P., ROCHA, I.V., ÖZKAN, M., ANGELIDAKI, I. Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and co-fermentation. **Bioresource Technology**. v.104, p.349-357, 2012.

LAVANHOLI, M.G.D.P. **Qualidade da cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de açúcar e álcool**. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. Cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agrônomo, p.697-722., 2008.

LEATHERS, T.D., Bioconversions of Maize Residues to Value-Added Coproducts using Yeast-Like Fungi. **FEMS Yeast Research**. n.3, p.133-140, 2003.

MACEDO, I.C. **Situação atual e perspectivas do etanol**. **Estudos avançados**, 21ª Edição, 59 p., 2006.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p. 638. 2006.

MANI, S., TABIL, L. G., OPUKU, A. **Ethanol from Agricultural Crop Residues – An Overview**. ASAE/CSAE North Central Intersectional Meeting, Canadá, 2002.

MARQUES, O.M. **Incorporação de lodo de esgoto em solo cultivado com cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado em Livre docência). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 111p.1996.

MARQUES, M.O.; MARQUES, T.A.; TASSO JÚNIOR, L.C. **Tecnologia do açúcar: produção e industrialização da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, 166 p. 2001.

MARQUES, T. A. **Apostila de análises tecnológicas usinas e destilarias**. Presidente Prudente, 51 p., 2007.

MAULE, R.F.; MAZZA, J.A.; MARTHA JR., G.B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, v.58, p.295-301, 2001.

MEADE, G.P.. **Cane sugar handbook**. 9ª Edição. John Wiley and Sons, *Inc.* New York. 17p. 1963.

MEGDA, M.X.V.; TRIVELIN, P.C.O.; FRANCO, H.C.J.; OTTO, R.; VITTI, A. C. Agronomic efficiency of nitrogen fertilizers on green harvesting sugarcane ratoon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 12, p. 1681-1690, 2012.

MENEGUETTI, C. C.; MEZAROBA, S.; GROFF, A. M. **Processos de produção do álcool etílico de cana-de-açúcar e os possíveis reaproveitamentos dos resíduos resultantes do sistema**. Encontro de Engenharia de Produção Agroindustrial, v.4, p.1-9, 2010.

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

MORAIS, A. P. S. **Estudo do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e caracterização físico-química.** Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Botucatu. 47 p. 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2ª edição. Universidade Federal de Lavras. Lavras. p. 729, 2006.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, E. B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology.** v.96, p.673, 2005.

MUCHOW, R. C. et al. Effect of nitrogen on the time-course of sucrose accumulation in sugarcane. **Field Crops Research,** v. 47, n. 2, p. 143-153, 1996.

NEVES, M.F; CONEJERO, M.A. **Estratégias para a cana no Brasil: um negócio classe mundial.** São Paulo: Atlas, 288 p., 2010.

OITICICA, A. G. R.; MELLO, A. J. P.; MOURA FILHO, G. **Resposta da cana-soca a fontes e doses de nitrogênio em área de vinhaça com palhiço da cana crua, variedade RB 83-102.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO. Anais. Brasília: SBCS/EMBRAPA, 1999.

OLIVEIRA, P. S. R.; ANDRADE, L. A. B.; VALE, F. R.; CARVALHO, G. J. **Influência da aplicação de nitrogênio nas características tecnológicas e rendimento industrial de duas variedades de cana-de-açúcar (ciclo de ano).** In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, Resumos. Caxambu: SBCS, p. 94, 1998.

ORLANDO FILHO, J.; RODELLA, A.A.; BELTRAME, J.A.; LAVORENTI, N.A. **Doses, fontes e formas de aplicação de nitrogênio em cana-de-açúcar.** STAB – Açúcar, Álcool e Sub-Produtos, Piracicaba, v. 17, p. 39-41, 1999.

PAN, Y. B., BURNER, D. M., LEGENDRE, B. L., GRISHAM, M. P., & WHITE, W. H. An assessment of the genetic diversity within a collection of *Saccharum spontaneum* L. with RAPD-PCR. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.51, n.8, p. 895-903. 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.; Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, p.69-80, 2000.

PARISI, F. Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilisation of the hydrolysates. **Advances in biochemical engineering biotechnology**. v.38, p.53-87, 1989.

PAYNE, J.H. **Operações unitárias na produção de açúcar de cana**; tradução Florenal Zarpelon. São Paulo: Nobel S.A., 1989.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; RUBIA, T.; MARTINEZ, J. Biodegradation and biological treatment of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**. v. 5. p. 53-63. 2002.

PHILIPPIDIS, G.P; HATZIS, C. Biochemical engineering analysis of critical process factors in the biomass-to-ethanol technology. **Biotechnology Progress**, v.13, p.222-231, 1997.

PITARELO, A.P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar a bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 143p. 2007.

RABELO, S.C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Tese (Doutorado em engenharia química). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. s.n. 447p., 2010.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. s.n. 180p., 2007.

REIS, A.L.S.; DUTRA, E.M; MENEZES, R.S.C.; MORAIS JR, M.A. Second-generation ethanol from sugarcane and sweet sorghum bagasses using the yeast *Dekkera bruxellensis*. **Industrial Crops and Products**. v.92. p255-262. 2016.

RHEIN, A.F.L.; PINCELLI, R.P.; ARANTES, M.T.; DELLABIGLIA, W.J.; KÖLLN, O.T.; SILVA, M.D.A.. Technological quality and yield of sugarcane grown under nitrogen doses via subsurface drip fertigation. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 3, p. 209-214, 2016.

RILEY, C. **Bioethanol: A Renewable Transportation Fuel from Biomass**. Spring Meeting and 13th Global Congress on Process Safety, 2002.

RIPOLI, T.C.C.; Energy potential of sugar cane biomass in Brazil. **Scientia Agricola**. v.57, p.677, 2000.

RIPOLI, T. C. C.; RIPOLI, M. L. C. **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. Piracicaba: Barros & Marques Ed. Eletrônica, 302p., 2004.

SALCEDO, I. H.; SAMPAIO, E. V. S. B. **Eficiência de utilização de uréia 15N por cana planta e três socas em tabuleiros costeiros de Pernambuco**. In: Congresso nacional da sociedade dos técnicos açucareiros - STAB, Recife: Anais, p. 46-49, 1987.

SALMAN, A.K.D.; FERREIRA, A.C.D.; SOARES, J.P.G; SOUZA, J.P. **Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos**. Documentos / Embrapa Rondônia, 0103-9865; v.136. 21p. 2010.

SAMPAIO, E. V. S. B.; SALCEDO, I. H.; BETTANY, J. Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar. I. Eficiência de utilização de ureia 15N em aplicação única ou parcelada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, n. 8, p. 943-949, 1984.

SÁNCHEZ, L. E. **Avaliação de impacto ambiental: conceitos e métodos**. São Paulo: Oficina de textos. 493p. 2009.

SANTOS, F.A.; QUEIROZ, J.H.; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**. v.35, n. 5, p.1004-1010, 2012.

SANTOS, F.A.; QUEIROZ, J.H.; COLODETTE, J.L.; MANFREDI, M.; QUEIROZ, M.E.L.R.; CALDAS, C.S.; SOARES, F.E.F. 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.

SEABRA, J.E.A. **Avaliação técnico-econômica de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil**. Tese (Doutorado em planejamento de sistemas energéticos). Universidade Estadual de Campinas, s.n., 298p., 2008.

SELIG, M.; WEISS, N.; JI, Y. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass, Laboratory Analytical Procedure (LAP), National Renewable Energy Laboratory, **NREL/TP-510-42629**. 8p. 2009.

SILVA, F. D.A.; AZEVEDO, C.D. **A new version of the assistat-statistical assistance software**. World Congress on Computers in Agriculture. American Society of Agricultural Engineers Orlando. p.399-396. 2006.

SILVA, C.T.S. da. **Efeito de diferentes níveis de adubação sobre a produção da terceira folha de cana irrigada nos tabuleiros costeiros da Paraíba**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 62f. 2003.

SILVA, L.C.F.; CASAGRANDE, J.C. **Nutrição mineral da cana-de-açúcar (macronutrientes)**. In: ORLANDO FILHO, J. Nutrição e adubação da cana-de-açúcar. IAA/Planalsucar, p. 77-99, 1983.

SILVEIRA, J.A.G.; CROCOMO, O.J. Assimilação de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em presença de elevado nível de N e de vinhaça no solo. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 2, p. 7-15, 1990.

SIMÕES NETO, D.E.; OLIVEIRA, A.C.; ROCHA, A.T.; FREIRE, F.J.; FREIRE, M.B.G.S.; NASCIMENTO, C.W.A. Características agroindustriais da cana-de-açúcar em função da adubação fosfatada, em solos de Pernambuco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.4, p.347-354, 2012.

SOBRAL, A. F.; CORDEIRO, D. D.; SANTOS, M. A. C. **Efeito da aplicação de vinhaça em socarias de cana-de-açúcar**. Brasil Açucareiro, v.98, n.5, p.52-58, 1981.

STUPIELLO, J. P; PEXE, C. A.; MONTEIRO, H.; SILVA, L. H. **Efeitos da aplicação de vinhaça como fertilizante na qualidade da cana-de-açúcar**. Brasil Açucareiro, v.90, n.3, p.41-50, 1977.

SZCZODRAK, J., FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v.10, n.5/6, p.367-375, 1996.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International journal of molecular sciences**. v.9, p.1621, 2008.

TASSO JÚNIOR, L.C., MARQUES, M. O., FRANCO, A., NOGUEIRA, G.A., NOBILE, F.A., CAMIOTTI, F., SILVA, A.R. Produtividade e qualidade de cana-de-açúcar cultivada em solo tratado com lodo de esgoto, vinhaça e adubos minerais. **Engenharia Agrícola**, v.27, n.1, p.276-283, 2007.

TRIVELIN, P.C.O.; OLIVEIRA, M.W.; VITTI, A.C.; GAVA, G.J.C.; BENDASSOLLI, J.A. Perdas de nitrogênio da uréia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 193-201, 2002

TRIVELIN, P.C.O.; BENDASSOLLI, J.A.; OLIVEIRA, M.W. Potencialidade da mistura de aquamônia com vinhaça na fertilização de canaviais colhidos sem despalha a fogo. Parte I: Estabilidade química da mistura. **STAB-Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.16, n.2, p.26-29, 1997.

VALE, D. W. **Efeito da aplicação de nitrogênio nos atributos químicos do solo, na nutrição e na produção de cana-de-açúcar.** Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. n. xxii, 120p.: il. 2009.

VALLANDER, L. ERIKSSON, K. E. Enzymic saccharification of pretreated wheat straw. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27.p. 650-659, 1985.

VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous foods. II. A rapid method for the determination of fibre and lignin. **Journal of the Association of the Official Analytical Chemists**, v.46, p.829-835, 1963.

WALDEMAR, G.V. Tecnologia do açúcar e do álcool – Açúcar. Curso de Tecnologia de Açúcar e Álcool. **Notas de aula. 2007.** Disponível em: <http://www2.fc.unesp.br/gsm/dnm/pdf/FabAcucar_2010.pdf>. Acesso em: dezembro, 2015.

WOOD, A.W. Management of crops residues following green harvesting of sugarcane in North Queensland. **Soil & Tillage research**. v.20, p.69-85, 1991.

WOOD, T.M., BHAT, K.M. **Methods for measuring cellulose activities.** W.A.Wood and S.T. Kellog, *Methods in enzymology*, n.160, p.87-116., 1988.

WOOLEY, R.; RUTH, M.; GLASSNER, D.; SHEEHAN, J.; Process design and costing of bioethanol technology: a tool for determining the status and direction of research and development. **Biotechnology Progress**. v.15, p.794, 1999.

WYMAN, C. E., Biomass Ethanol: Technical Progress, Opportunities and Commercial Challenges. **Annual Review of Environment and Resources**. v.24, p.189-226, 1999.

ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and bioengineering**. v.88, p.797, 2004.

ZHANG, Y.H.P.; Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v.35, p.367, 2008.

ZHAO, X. B.; WANG, L.; LIU, D. H.; Effect of several factors on peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v.83, p.950, 2008.

ZHENG, Y.I.; PAN, Z.; ZHANG, R.; WANG, D.; Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated saline crops for fermentable sugar production. **Applied Energy**. v.86, p.2459, 2009.