
**PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A
PARTIR DE BIOMASSA RESIDUAL DA INDÚSTRIA DE
CELULOSE**

Neumara Luci Conceição Silva



Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos para a Obtenção do Grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

Orientador: Nei Pereira Jr., *Ph.D.*

**Escola de Química
Universidade Federal do Rio de Janeiro**

2010

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE
BIOMASSA RESIDUAL DA INDÚSTRIA DE CELULOSE**

Neumara Luci Conceição Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

Escola de Química
Universidade Federal do Rio de Janeiro

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

S586p Silva, Neumara Luci Conceição

Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose/ Neumara Luci Conceição Silva. – 2010.

xiii, 109 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Porcessos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

Orientador: Nei Pereira J.r, Ph.D.

1. Bioetanol. 2. Biomassa residual. 3. Indústria de celulose. – Teses. I. Pereira Jr., Nei (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. IV. Título.

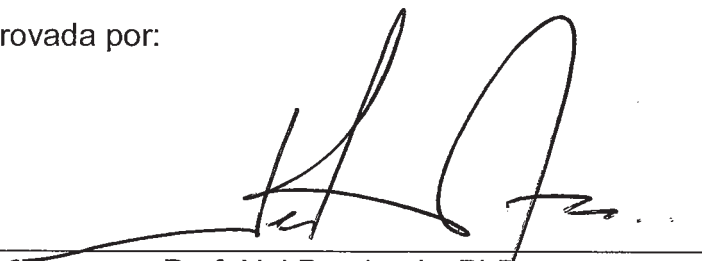
CDD: 665.776

PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE
BIOMASSA RESIDUAL DA INDÚSTRIA DE CELULOSE

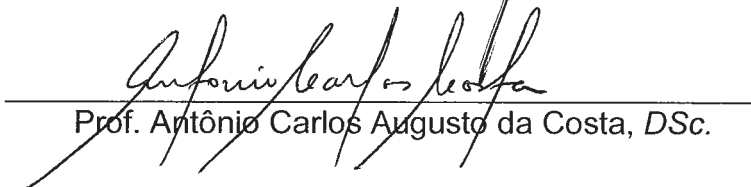
Neumara Luci Conceição Silva

Dissertação submetida ao corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

Aprovada por:



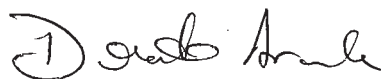
Prof. Nei Pereira Jr. *PhD.*
Orientador (Presidente da Banca)



Prof. Antônio Carlos Augusto da Costa, *DSc.*



Lídia Maria Melo Santa Anna, *DSc.*



Prof. Donato Alexandre Gomes Aranda, *DSc.*

Rio de Janeiro, RJ - Brasil
Maio de 2010

Aos meus pais, fontes de minhas forças, à minha irmã, exemplo que sempre procurei seguir, e ao meu amor, Petteri, dedico-lhes este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir realizar mais um sonho;

Ao professor Nei Pereira Jr. pela compreensão, confiança, oportunidade de trabalhar em seus laboratórios e ser orientada por um admirável e excepcional pesquisador-professor, que compartilhou seu conhecimento e experiência;

Aos meus amigos e colegas de trabalho Roberto Nobuyuki Maeda e Gabriel Jaime Vargas Betancur pela colaboração, atenção, conhecimento, paciência e valiosa amizade;

À Heloísa Barros Bastos, pela dedicação, carinho, companherismo e, principalmente, colaboração nos experimentos realizados.

Aos estudantes e funcionários dos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos, em especial a Carolina Barcelos, Mariana Mello, Felipe Oliveira, Luiz Claudio e Jorge, pela ajuda na solução de problemas e pelo companherismo que tornaram o ambiente de trabalho muito agradável;

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da Escola de Química pela atenção e ajuda na solução de problemas burocráticos;

Ao Petteri, pela compreensão, confiança, companherismo, carinho, apoio e por toda colaboração direta ou indireta durante esta minha importante jornada;

Aos funcionários da empresa Aracruz Celulose, Rudine Antes, Braz José Demuner e Pablo Cadaval Santos por fornecerem tão prontamente informações sobre o trabalho;

Aos professores Maulori Currie Cabral e Maria Isabel Liberto pelos valiosos ensinamentos recebidos durante minha vida acadêmica;

À minha família, por acreditar e apoiar desde os meus pequenos desejos até os grandes e difíceis sonhos;

À PETROBRÁS e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE BIOMASSA RESIDUAL DA INDÚSTRIA DE CELULOSE

Resumo da Dissertação de *M.Sc.* apresentada ao programa de pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Brasil.

Neumara Luci Conceição Silva

Orientador: Nei Pereira Jr.

A grande dependência de fontes de energia não renováveis e altamente poluentes, como o petróleo e seus derivados, tem levado a sociedade a buscar alternativas para a utilização de combustíveis renováveis. As pesquisas atuais sinalizam como tecnologia emergente a produção de etanol combustível a partir de biomassas residuais de composição lignocelulósica. Neste contexto, o presente trabalho objetivou produzir bioetanol carburante empregando uma concepção de processo denominado SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) a partir da celulose contida no resíduo oriundo do sistema de decantação da indústria de celulose, utilizando linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e visando estabelecer condições que aumentassem a produtividade e eficiência do processo. Como resultados desta dissertação, foram obtidas as melhores condições da pré-hidrólise enzimática (relação sólido:líquido 1:4 e 17,5 FPU/g de carga enzimática) e determinadas as condições que conferiram o maior valor para a produtividade volumétrica (16 h de pré-hidrólise enzimática, 8 g/L para concentração celular e 36 h de fermentação). A máxima concentração de etanol obtida quando o processo SSF foi conduzido em frascos agitados, foi de 77,6 g/L em 64 h, empregando *Saccharomyces cerevisiae* de panificação. O melhor resultado obtido quando a fermentação foi conduzida em biorreator, foi de 74,6 g/L em 64 h, utilizando celulasas comerciais (Multifect) e suplementando o hidrolisado enzimático com fontes de fosfato e nitrogênio e soluções de sais minerais e ácido cítrico, que foi fermentado por uma cepa industrial de *S. cerevisiae* codificada como JP1. Os resultados mostraram-se bastante promissores e apontam para maiores desdobramentos.

SECOND GENERATION BIOETHANOL PRODUCTION FROM RESIDUAL BIOMASS OF CELLULOSE INDUSTRY

Abstract of the M.Sc. dissertation presented to the post graduation program on Technology of Chemical and Biochemical Process of the Chemistry School of Federal University of Rio de Janeiro – Brazil.

Neumara Luci Conceição Silva

Supervisor: Nei Pereira Jr.

The large reliance on non-renewable sources and highly polluting fuels such as petroleum and its derivatives, has led the society to seek alternatives to the use of renewables. Current research indicates as emerging technology the production of fuel ethanol from residual biomass of lignocellulosic composition. This study aimed at producing fuel ethanol using a design process called SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) from the cellulose containing residue arisen from the separating system of the cellulose manufactory, using strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The work also aimed at establishing process conditions that increase the productivity and efficiency. As results of this study, the best pre-enzymatic hydrolysis conditions (solid:liquid ratio 1:4 and 17.5 FPU/g of enzyme loading) was obtained and the conditions that allowed the highest volumetric ethanol productivity was determined (16 h pre-hydrolysis, 8.0 g/L for cell concentration and 36 h of fermentation). The maximum ethanol concentration, obtained when the SSF process was performed in flasks, was 77.6 g/L in 64 hours, using the bakery yeast *Saccharomyces cerevisiae*. On the other hand, when the fermentation was carried out in bioreactor, the highest ethanol concentration was 74.6 g/L at 64 h of SSF process, using a commercial enzyme preparation (Multifect) and supplementing the enzymatic hydrolysate with sources of phosphate and nitrogen and mineral salts and citric acid solution, which was fermented by an industrial strain of *S. cerevisiae* coded as JP1. The results were very promising and point to major developments.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

1. APRESENTAÇÃO DO TEMA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO	1
---	----------

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. BIOMASSA: FONTE DE BIOENERGIA	5
2.1.1. Celulose	8
2.1.2. Hemicelulose	10
2.1.3. Lignina	11
2.1.4. Pré-tratamentos	12
2.1.5. A celulose no contexto de biorrefinaria	13
2.1.6. Hidrólise enzimática da celulose	14
2.2. A INDÚSTRIA DE CELULOSE	16
2.2.1. Produção de celulose	19
2.2.2. Resíduos gerados na produção de celulose	22
2.2.3. Aspectos econômicos da indústria de celulose	24
2.3. O BIOETANOL NO CONTEXTO DE 2ª GERAÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS	26
2.3.1. Dimensões técnicas e ambientais do uso de bioetanol como combustível veicular	26
2.3.2. Evolução do bioetanol combustível no mercado	28
2.3.3. Progresso das ações ambientalistas	33
2.3.4. Produção de bioetanol de segunda geração	34
2.3.5. Estratégias para a produção de bioetanol de segunda geração	37
2.3.6. Principais resultados reportados na literatura	42

CAPÍTULO 3

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	45
3.1. JUSTIFICATIVA	45
3.2. OBJETIVOS	46

CAPÍTULO 4

4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1. MATÉRIA-PRIMA	48
4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS PM1, PM2 E PM3	50
4.3. MICROORGANISMO	50
4.3.1. Manutenção, ativação e propagação celular de <i>S. cerevisiae</i> JP1	50
4.4. AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DE PM1, PM2 E PM3 PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL	52
4.5. ESTUDO COMPARATIVO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PM1, PM2 E PM3	53
4.6. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO SSF DE PM3	54
4.6.1. Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)	54
4.6.2. Planejamento univariável	55
4.6.3. Validação das melhores condições do processo SSF	55
4.7. DESEMPENHO DAS CELULASES LADEBIO NO PROCESSO SSF DE PM3	55
4.8. SUPLEMENTAÇÃO DO HIDROLISADO	56
4.9. MÉTODOS ANALÍTICOS	57
4.9.1. Determinação de açúcares e etanol	57
4.9.2. Quantificação celular	58

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS PM1, PM2 E PM3	60

5.2. AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DE PM1, PM2 E PM3 PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL	61
5.3. ESTUDO COMPARATIVO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PM1, PM2 E PM3	64
5.4. PLANEJAMENTO SEQUENCIAL PARA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO SSF	73
5.4.1. DCCR	73
5.4.2. Planejamento univariável	79
5.4.3. Validação das melhores condições do processo SSF em frascos agitados	84
5.5. PROCESSOS SSF CONDUZIDOS EM BIORRETAOR	85
5.5.1. Processo SSF empregando a linhagem industrial <i>S. cerevisiae</i> JP1 e celulases comerciais Multifect	85
5.5.2. Processo SSF empregando <i>S. cerevisiae</i> JP1 como inóculo e consórcio celulásico LADEBIO	89
5.5.3. Processo SSF empregando <i>S. cerevisiae</i> JP1, celulases comerciais Multifect e hidrolisado suplementado com fontes de nitrogênio, fosfato e sais minerais	92
5.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
CAPÍTULO 6	
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	98
6.1. CONCLUSÕES	98
6.2. SUGESTÕES	100
CAPÍTULO 7	
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico	7
Figura 2.2. Estrutura química da celulose	9
Figura 2.3. Componentes da fração hemicelulose	10
Figura 2.4. Precursores primários da lignina	12
Figura 2.5. Biorrefinaria de matérias-primas lignocelulósicas: produtos da celulose	14
Figura 2.6. Fluxograma de blocos da produção da pasta de celulose	20
Figura 2.7. Evolução da produção brasileira de celulose	24
Figura 2.8. Destinos das exportações brasileiras de celulose	25
Figura 2.9. Evolução das emissões de gases dos veículos brasileiros	28
Figura 2.10. Evolução da produção de cana-de-açúcar, etanol e açúcar no Brasil	29
Figura 2.11. Teor médio de etanol anidro na gasolina brasileira	29
Figura 2.12. Evolução da produção de veículos a etanol hidratado e de sua participação nas vendas de veículos novos	30
Figura 2.13. Evolução dos preços médios para o consumidor do bioetanol hidratado e da gasolina comum no Brasil	31
Figura 2.14. Vendas de álcool etílico e de gasolina automotiva no Brasil	31
Figura 2.15. Evolução da produção de bioetanol do Brasil e dos EUA	32
Figura 2.16. Produção mundial de bioetanol combustível em 2008	32
Figura 2.17. Perspectivas da produção de biocombustíveis	33
Figura 2.18. Fermentação alcoólica	36
Figura 2.19. Diagrama da Sacarificação e Fermentação em Separado (SHF)	38
Figura 2.20. Diagrama da Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF)	39
Figura 2.21. Diagrama do processo de Sacarificação e Co-Fermentação Simultânea	40
Figura 2.22. Diagrama do Bioprocesso Consolidado (CBP)	41
Figura 4.1. Fluxograma da produção de celulose	49
Figura 4.2. Polpas PM1 e PM2 e resíduo PM3 da indústria de celulose	49
Figura 4.3. Biorreator instrumentado	52
Figura 4.4. Fermentômetro	58
Figura 4.5. Regressão linear e coeficiente de correlação para a quantificação de biomassa de <i>S. cerevisiae</i> JP1	59
Figura 5.1. Concentração de açúcares após 12 h de pré-hidrólise enzimática, utilizando relação S:L 1:4 e 32 FPU/g de carga enzimática	62
Figura 5.2. Perfis cinéticos do processo SSF das biomassas PM1, PM2 e PM3, empregando 2 g/L de <i>S. cerevisiae</i> de panificação	63

Figura 5.3. Concentração de açúcares e etanol após 96 h de SSF	63
Figura 5.4. Hidrólise enzimática da biomassa PM1	66
Figura 5.5. Hidrólise enzimática da biomassa PM2	66
Figura 5.6. Hidrólise enzimática da biomassa PM3	66
Figura 5.7. Gráfico de Pareto para a concentração de glicose (g/L) como variável de resposta da hidrólise enzimática de PM1	69
Figura 5.8. Gráfico de Pareto para a concentração de glicose (g/L) como variável de resposta da hidrólise enzimática de PM2	69
Figura 5.9. Gráfico de Pareto para a concentração de glicose (g/L) como variável de resposta da hidrólise enzimática de PM3	70
Figura 5.10. Superfície de resposta para a concentração de glicose (g/L) como variável de resposta da hidrólise enzimática de PM1	70
Figura 5.11. Superfície de resposta para a concentração de glicose (g/L) como variável de resposta da hidrólise enzimática de PM2	71
Figura 5.12. Superfície de resposta para a concentração de glicose (g/L) como variável de resposta da hidrólise enzimática de PM3	71
Figura 5.13. Concentração de glicose após hidrólise enzimática de PM1, PM2 e PM3	72
Figura 5.14. Perfis cinéticos dos processos SSF do DCCR para PM3	74
Figura 5.15. Gráfico de Pareto para a concentração de etanol (g/L) como variável de resposta do SSF de PM3	78
Figura 5.16. Superfície de resposta para concentração de etanol (g/L) como variável de resposta do SSF de PM3	78
Figura 5.17. Experimento 8 do DCCR para SSF de PM3	79
Figura 5.18. Perfis cinéticos de SSF do planejamento univariável	81
Figura 5.19. Concentrações de etanol equivalente e etanol (CLAE) do planejamento univariável	81
Figura 5.20. Perfil cinético do SSF na validação das melhores condições do processo SSF com PM3 em frascos agitados	84
Figura 5.21. Cinética do pré-inóculo de <i>S. cerevisiae</i> JP1	86
Figura 5.22. Cinética do crescimento de <i>S. cerevisiae</i> JP1 em biorreator	87
Figura 5.23. Perfil cinético do processo SSF de PM3 em biorreator empregando <i>S. cerevisiae</i> JP1 e celulases Multifect	88
Figura 5.24. Perfil cinético do processo SSF de PM3 em biorreator empregando celulases LADEBIO e <i>S. cerevisiae</i> JP1	90
Figura 5.25. Perfil cinético do processo SSF de PM3 em biorreator com hidrolisado suplementado com fontes de nitrogênio, fosfato de potássio, solução de sais minerais e ácido cítrico	93

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Composição química parcial de alguns materiais lignocelulósicos	8
Tabela 2.2. Diferenças entre hemicelulose e celulose	11
Tabela 2.3. Comparação de rotação e rendimento de árvores	17
Tabela 2.4. Caracterização de espécies de eucalipto	19
Tabela 2.5. Maiores produtos mundiais de celulose em 2008	25
Tabela 2.6. Propriedades da gasolina e do bioetanol	26
Tabela 2.7. Condições empregadas para produção de bioetanol de segunda geração por SSF na literatura	43
Tabela 4.1. Meio de cultura para manutenção da <i>S. cerevisiae</i> JP1	50
Tabela 4.2. Meio de cultura para crescimento do pré-inóculo	51
Tabela 4.3. Composição da solução de sais minerais e ácido cítrico	51
Tabela 4.4. Intervalo utilizado para construir o DCCR para a hidrólise enzimática de PM1, PM2 e PM3	53
Tabela 4.5. Intervalo utilizado para construir o DCCR para o processo SSF de PM3	54
Tabela 5.1. Caracterização das biomassas PM1, PM2 e PM3	61
Tabela 5.2. Concentrações de açúcares e etanol no início e final do SSF	63
Tabela 5.3. Concentração de açúcares liberados na hidrólise enzimática (HE) de PM1	67
Tabela 5.4. Concentração de açúcares liberados na hidrólise enzimática (HE) de PM2	67
Tabela 5.5. Concentração de açúcares liberados na hidrólise enzimática (HE) de PM3	67
Tabela 5.6. Concentração de açúcares no início do SSF e de etanol equivalente, açúcares e etanol no final do processo (48h)	75
Tabela 5.7. Análise de variância (ANOVA) para concentração final de etanol do DCCR	77
Tabela 5.8. Concentração de açúcares no início do SSF e de etanol equivalente (equiv.), açúcares e etanol no final dos processos SSF (36h) do planejamento univariável	82
Tabela 5.9. Concentração de açúcares no início do SSF e de etanol equivalente (equiv.), açúcares e etanol no final do SSF (36h) na validação das melhores condições	84
Tabela 5.10. Concentração de açúcares e etanol no início e final do processo (64h) em biorreator empregando <i>S. cerevisiae</i> JP1 e celulasas Multifect	89
Tabela 5.11. Concentração de açúcares e etanol no início e final do processo (64h) em biorreator empregando <i>S. cerevisiae</i> JP1 e celulasas LADEBIO	92
Tabela 5.12. Concentração de açúcares e etanol no início e final do SSF (64h) em biorreator empregando <i>S. cerevisiae</i> JP1, celulasas Multifect e hidrolisado suplementado	94
Tabela 5.13. Condições utilizadas e resultados obtidos em cada etapa da pesquisa	96

CAPÍTULO 1

1. APRESENTAÇÃO DO TEMA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

O suprimento de energia está na base da estruturação e da dinâmica operacional da sociedade humana nos seus mais diversos aspectos, desde o bem-estar individual até o desempenho industrial e de prestação de serviços. Neste contexto, o petróleo tem tido uma importância ímpar, sendo responsável pelo fornecimento de um terço da energia primária consumida no planeta. Assim, alterações no suprimento ou no uso do petróleo teriam desdobramentos econômicos, políticos e sociais importantes para a maior parte das nações do mundo. A sociedade humana depara-se, agora, com a escassez e com o aumento do preço desta fonte não renovável de energia. Avaliações mais pessimistas afirmam que em torno de 41 anos chegar-se-ia à sua total depleção (ODAC, 2007). Paralelamente, a combustão crescente de combustíveis fósseis, iniciada há 60 anos, tem gerado, juntamente com o desmatamento, o acúmulo na atmosfera de gases poluentes, particularmente de CO₂, responsáveis pelo efeito estufa e conseqüentes alterações climáticas. Esse atual quadro exige mudanças nos padrões de industrialização e de consumo da sociedade humana, de forma a reduzir a emissão de gases de efeito estufa (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

Embora as “crises de petróleo” anteriores, como a dos anos 1970, responsáveis pelo aumento do preço do petróleo, tenham sido episódicas, a conjunção e sinergia dos fatores acima mencionados, indicam uma tendência crescente e irreversível no aumento do preço do petróleo e, em um prazo mais longo, a diminuição do seu uso.

Neste contexto, a busca por fontes renováveis de energia e de alternativas ao uso do petróleo está mobilizando internacionalmente e de forma ímpar setores acadêmicos, industriais, sociais e governamentais com ênfase no desenvolvimento de processos biotecnológicos de menor impacto ambiental (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

O Brasil já vem, por muitas décadas, utilizando apenas álcool como combustível ou sob a forma de uma mistura contendo de 22% a 25% de álcool na gasolina, colocando o país em uma posição extremamente favorável internacionalmente, em termos de emissão de CO₂. Atualmente, o Brasil produz 25 bilhões de etanol por ano a partir da cana-de-açúcar. O plantio dessa matéria-prima, realizado em terras aráveis de boa qualidade, deverá ser expandido devido à crescente demanda nacional e internacional de álcool (MAPA, 2010).

No entanto, para evitar a expansão desmedida das áreas de cultivo, têm se desenvolvido processos biotecnológicos que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica, abundantemente geradas nos setores agrícolas e florestais. Dentre estas biomassas, os resíduos celulósicos provenientes da produção de pasta de celulose e separados na etapa de decantação constituem uma das fontes mais promissoras de carboidratos para a produção de bioetanol de segunda geração.

Os resíduos lignocelulósicos agroindustriais são matérias-primas de grande interesse industrial uma vez que podem ser utilizadas para a produção de uma gama de produtos, não somente o etanol. Os materiais lignocelulósicos são constituídos majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina. Dentro do conceito de biorrefinaria, as frações devem ser separadas seletivamente de acordo com suas características e as do produto desejado, sendo necessário desenvolver processos eficientes para disponibilizar os monômeros (açúcares) e para a transformação destes através de processos de fermentação com altas taxas de produção (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

No caso da utilização da celulose contida no resíduo fibroso do sistema de decantação da indústria de celulose, faz-se necessário a sua hidrólise, utilizando enzimas específicas, que pode ser conduzida em sinergia com o processo de fermentação da glicose, o qual se denomina Sacarificação e Fermentação Simultânea (*Simultaneous Saccharification and Fermentation – SSF*).

No presente estudo tencionou-se desenvolver um processo SSF para o aproveitamento da celulose, contida no resíduo sólido proveniente do sistema de decantação da indústria de celulose, para a produção de bioetanol combustível.

Composta de sete capítulos, a presente dissertação procurou cobrir de forma abrangente esta complexa temática. No primeiro capítulo, é apresentado de forma sumarizada, o paradigma deficiente que a população mundial vive com os combustíveis de origem fóssil, apontando suas principais problemáticas e destacando o bioetanol como excelente alternativa de combustível veicular.

O segundo capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre os temas que tangem a temática do presente trabalho: a biomassa lignocelulósica como fonte de bioenergia; a produção de celulose e seus resíduos; e o bioetanol, relatando a importância do seu uso, a sua produção e as estratégias para a obtenção desta substância química.

As justificativas e os objetivos que nortearam a construção deste presente trabalho são relatados no terceiro capítulo. Os materiais utilizados e as metodologias empregadas são descritas no quarto capítulo, enquanto os resultados obtidos, assim como a análise estatística e fenomenológica dos mesmos são apresentados no quinto capítulo. No sexto capítulo, encontram-se as conclusões obtidas a partir dos experimentos realizados e as sugestões para a continuidade deste trabalho. As referências utilizadas para dar embasamento textual ao trabalho são listadas no sétimo capítulo.

A seguir, estão listados os artigos publicados, em revistas indexadas e anais de congressos nacionais, decorrentes do desenvolvimento do trabalho de pesquisa desta dissertação de mestrado.

SILVA, N.L.C; BETANCUR, G.J.V.; VASQUEZ , M.P.; BARROS, E.; PEREIRA Jr., N. (2010). Ethanol production from residual wood chips of cellulose industry: Acid pretreatment investigation, hemicellulosic hydrolysate fermentation and remaining solid fraction fermentation by SSF process. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (no prelo).

SILVA, N.L.C; BASTOS, H.B.; PEREIRA Jr., N. (2009). Second generation ethanol production from residual biomass of cellulose industry. *Artigo submetido ao Brazilian Journal of Chemical Engineering*.

SILVA, N.L.C; BETANCUR, G.J.V.; PEREIRA Jr., N. (2009). Produção de bioetanol a partir de cavaco residual da indústria de celulose: Otimização do pré-tratamento ácido e fermentação do hidrolisado hemicelulósico. *Trabalho completo publicado nos anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)*, CD-ROM, 6 páginas.

SILVA, N.L.C; BASTOS, H.B.; BETANCUR, G.J.V.; MAEDA, R.N.; PEREIRA Jr., N. (2009). Produção de etanol de segunda geração a partir de biomassas residuais da indústria de celulose. *Trabalho completo publicado nos anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)*, CD-ROM, 6 páginas.

SILVA, N.L.C; BETANCUR, G.J.V.; PEREIRA Jr., N. (2009). Avaliação do potencial da biomassa residual da indústria de celulose para a produção de bioetanol. *Trabalho completo publicado nos anais do IX Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB)*, CD-ROM, 7 páginas.

SILVA, N.L.C; MAEDA, R.N.; PEREIRA Jr., N. (2009). Otimização da hidrólise enzimática da biomassa residual da indústria de celulose. *Trabalho completo publicado nos anais do IX Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB)*, CD-ROM, 12 páginas.

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados os diferentes aspectos teóricos que tangem a temática abordada: a biomassa, como material lignocelulósico, e os meios de sua conversão em bioetanol; a indústria de celulose e sua produção, relatando as matérias-primas utilizadas e os resíduos gerados neste processo; e o bioetanol, abordando suas dimensões técnicas e ambientais, evolução do seu uso como combustível veicular, sua produção e as estratégias concebidas para este fim.

2.1. BIOMASSA: FONTE DE BIOENERGIA

Em geral, denomina-se biomassa qualquer matéria de origem vegetal que dispõe de bioenergia e que pode ser processada para fornecer formas bioenergéticas mais elaboradas e adequadas para o uso final. Portanto, seriam exemplos de matérias a lenha, os resíduos de serrarias, o carvão vegetal, o biogás resultante da decomposição de lixo orgânico e de outros resíduos agropecuários, bem como os biocombustíveis líquidos, como o bioetanol e o biodiesel. No amplo contexto da bioenergia, a produção de biocombustíveis líquidos a partir de biomassa

tem sido considerada para atender particularmente às necessidades de transporte veicular. Para esses fins, ainda não existem outras alternativas renováveis, além dos biocombustíveis, com maturidade tecnológica e viabilidade econômica suficientes (ZHANG & SMITH, 2007).

Com exceção da cana-de-açúcar, as tecnologias comercialmente disponíveis na atualidade para a produção de bioetanol de primeira geração a partir de biomassas sacaríneas e amiláceas envolvem ganhos energéticos e ambientais bastante estreitos. Além disso, essas matérias-primas apresentam uma limitada vantagem econômica e encontram, em geral, mercados alternativos mais remuneradores, como alimentos ou insumos para outros fins. Entretanto, apesar de suas destacadas vantagens, a cana-de-açúcar não é uma opção viável para todas as regiões do planeta. E por esse motivo, os países do hemisfério norte vêm procurando incessantemente rotas tecnológicas que permitam a produção de um biocombustível eficiente, tanto do ponto de vista ambiental quanto do ponto de vista econômico (BNDES, 2008).

A tendência de estudos, como já havia sido reportado por VÁSQUEZ *et al.* (2007), é desenvolver processos biotecnológicos que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica, como palha de milho e arroz, bagaço de cana-de-açúcar e resíduos da indústria de celulose, abundantemente geradas nos setores agrícolas e florestais, para a produção de bioetanol de segunda geração.

O bioetanol de segunda geração vem sendo produzido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos desde o fim do século XIX, mas somente nos últimos 20 anos essa tecnologia tem sido proposta para atender o mercado de combustíveis. Os principais programas de pesquisa e desenvolvimento são conduzidos nos Estados Unidos e na Europa, basicamente em escalas experimentais de produção, mas seu sucesso poderia transformar o bioetanol em um biocombustível passível de ser produzido em quase todas as regiões do mundo, aproveitando a alta disponibilidade de resíduos orgânicos de diversas fontes. Praticamente todos os resíduos de biomassa, produzidos nas atividades agrícolas e industriais, e mesmo o lixo urbano, apresentam elevados teores de materiais lignocelulósicos (MACEDO *et al.*, 2008).

A população humana produz milhões de toneladas de resíduos agroflorestais anualmente. O Brasil, por exemplo, produziu em 2007 aproximadamente 400 milhões de toneladas de subprodutos agroflorestais, incluindo os resíduos gerados na indústria de celulose (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

Os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose (cerca de 70% da massa seca), entremeados por outra macromolécula formada por álcoois aromáticos, a lignina, aos quais se encontram unidos por ligações covalentes e de hidrogênio (Figura 2.1) (LEE, 1997). Em menores proporções, e dependendo da origem do vegetal, também podem ser encontrados resinas, ácidos graxos, fenóis, taninos, compostos nitrogenados e sais minerais, principalmente, de cálcio, potássio e magnésio (NEUREITER *et al.*, 2002).

As tecnologias para a obtenção de bioetanol de segunda geração, produzido a partir de materiais lignocelulósicos, envolvem a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentáveis e sua posterior fermentação. Para executar essa tarefa, o processo de hidrólise utiliza tecnologias complexas e multifásicas, com base no uso de rotas ácidas e/ou enzimáticas para a separação dos açúcares e remoção da lignina (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

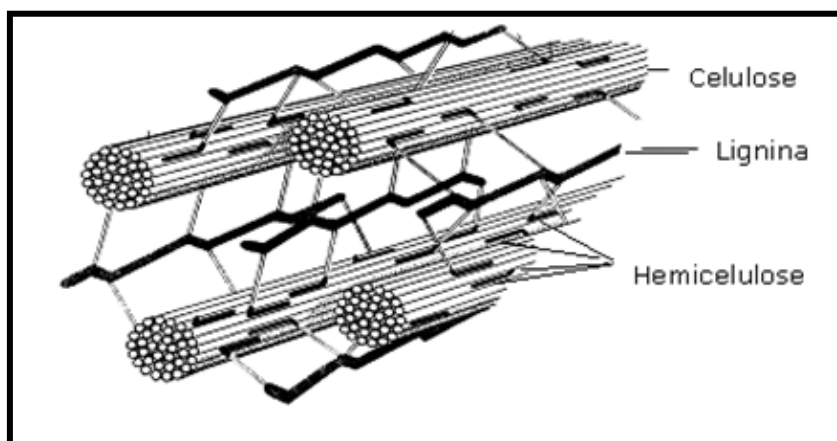


Figura 2.1. Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico (LEE, 1997)

A composição e a estrutura da biomassa têm forte influência na natureza e nos rendimentos dos processos de hidrólise e fermentação. Sendo que a composição básica da biomassa lignocelulósica depende do vegetal de origem e, no

caso de biomassas agroflorestais residuais, da região, idade e período de coleta do material. Na Tabela 2.1 pode ser visualizada a variação da composição química básica de algumas biomassas de composição lignocelulósica.

Tabela 2.1. Composição química parcial de alguns materiais lignocelulósicos

Material lignocelulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Farelo de cevada	23,0	32,7	24,4
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3
Folhas de milho	37,6	34,5	12,6
Bagaço de cana	40,2	26,4	25,2
Palha de arroz	43,5	22,0	17,2
Palha de trigo	33,8	31,8	20,1
Palha de sorgo	34,0	44,0	20,0
Casca de aveia	30,5	28,6	23,1
<i>Eucalyptus grandis</i>	40,2	15,7	26,9
<i>Eucalyptus globulus</i>	46,3	17,1	22,9

Fonte: TAMANINI & HAULY (2004); CANETTIERI *et al.* (2001); MUSSATO & ROBERTO (2002)

Desta maneira, faz-se necessário conhecer a estrutura e as principais características dos principais componentes da biomassa lignocelulósica: celulose, hemicelulose e lignina.

2.1.1. Celulose

A celulose (23% - 50% da matéria seca da biomassa lignocelulósica) é um polímero linear que contém até 15.000 unidades de β -D-glicoses unidas por ligações glicosídicas β -1,4 carbono-carbono e por ligações de hidrogênio intramoleculares (ligações entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes) (Figura 2.2) (ARANTES & SADDLER, 2010).

As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez; e as ligações intramoleculares são responsáveis pela formação de fibrilas, estruturas altamente ordenadas que se associam formando as fibras de celulose. As fibrilas apresentam

desde regiões com elevado grau de cristalinidade, nas quais as cadeias de glicana estão firmemente ligadas em paralelo, até regiões com menor grau de ordenação, chamadas de regiões amorfas. Na região cristalina, as fibras têm maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação (absorção de solvente) que na região amorfa, onde a fibra possui sua maior flexibilidade (VÁSQUEZ *et al.*, 2007).

O índice de cristalinidade e o grau de polimerização são propriedades importantes para a classificação dos polímeros celulósicos. O grau de polimerização informa a frequência relativa de ligações glicosídicas internas e terminais, disponíveis para atuação de celulasas. Pode ser definido com base no número médio de monômeros e no peso médio do polímero, assim como inferido a partir de sua viscosidade. Já o índice de cristalinidade está associado à reatividade do substrato e pode ser quantificado pelo método de difração de raios X (D'ALMEIDA, 1988).

Estas características, juntamente com o envoltório de lignina, conferem à macromolécula celulose grande resistência à hidrólise, o que representa um grande desafio para a utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas, como a produção de etanol de segunda geração (ARANTES & SADDLER, 2010).

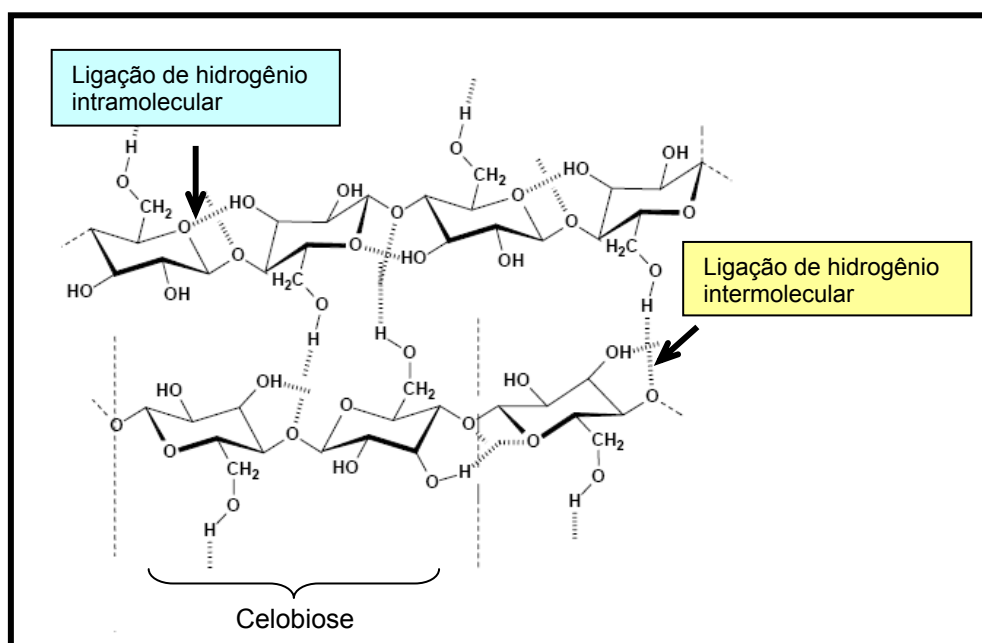


Figura 2.2. Estrutura química da celulose (MORAIS, 2005)

2.1.2. Hemicelulose

Por sua vez, a fração hemicelulósica (15% - 45% do material lignocelulósico seco) consiste em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como xilose e arabinose, e aldohexoses, como glicose, manose e galactose. Esta macromolécula contém ainda, ácidos hexurônicos, como os ácidos β -D-glucurônico, D-4-O-metilglucurônico e β -D-galacturônico, e deoxiexoses (Figura 2.3). A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (KOOTSTRA *et al.*, 2009).

Diferentemente da celulose, a hemicelulose apresenta baixa massa molecular (100-200 unidades glicosídicas) e não contém regiões cristalinas, sendo, portanto, mais suscetível à hidrólise química sob condições mais brandas. Porém, a fermentação dos açúcares de cinco carbonos (pentoses) ainda não é tão desenvolvida quanto os processos envolvendo a glicose (SUN & CHENG, 2005).

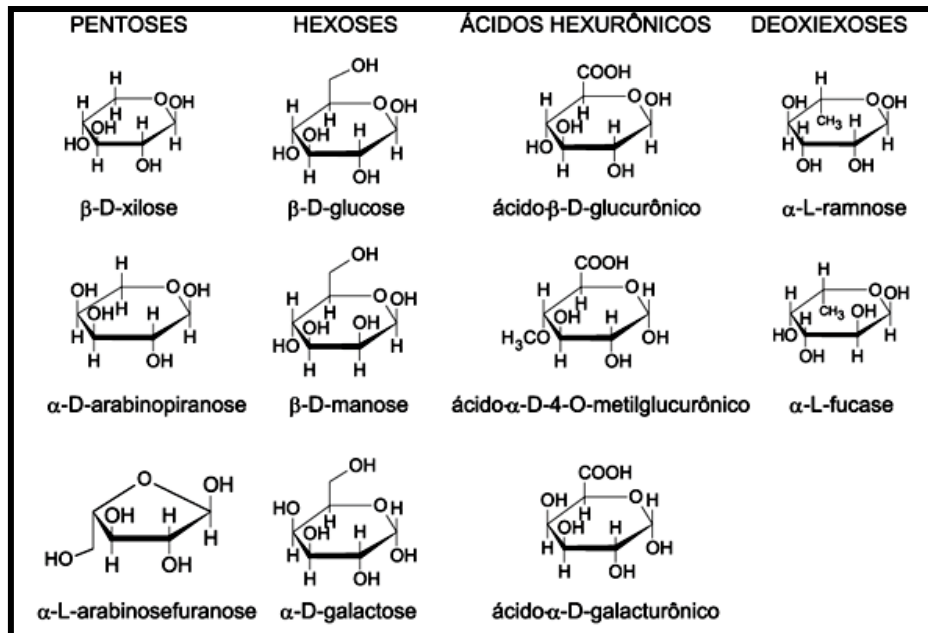


Figura 2.3. Componentes da fração hemicelulose (MORAIS, 2005)

A Tabela 2.2 resume as principais características da celulose e hemicelulose. O entendimento destas características é de fundamental importância para a

definição das estratégias de aproveitamento das biomassas como matérias-primas para a produção de bioetanol e de outras substâncias químicas.

Tabela 2.2. Diferenças entre hemicelulose e celulose

CELULOSE	HEMICELULOSE
Unidades de glicose unidas entre si	Unidades de diferentes pentoses e hexoses ligadas entre si
Alto grau de polimerização (1000 a 15000 unidades de glicose)	Baixo grau de polimerização (60 a 300 unidades de açúcares)
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Apresenta regiões amorfas e cristalinas	Apresenta somente regiões amorfas
É atacada lentamente por ácido inorgânico diluído a quente	É atacada rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente
É insolúvel em álcalis	É solúvel em álcalis

Fonte: PEREIRA Jr. *et al.* (2008)

2.1.3. Lignina

Já a estrutura bioquímica da fração lignina (10% - 30%) não está relacionada a moléculas simples de açúcar, não sendo pretendida por isso, para a produção de bioetanol por rotas fermentativas. Essa fração, no entanto, desempenha um papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise, uma vez que dificulta o acesso à celulose. A estrutura da lignina apresenta forma tridimensional e é formada por unidades de *p*-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, unidas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si. Esta macromolécula é formada pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 2.4) (LEMOS, 2001).

A lignina representa um dos maiores estoques de carbono/energia da natureza e é o maior depósito de estruturas químicas aromáticas, constituindo-se em uma fonte potencial de valiosos insumos para a indústria química. Apesar de ser possível produzir diversos produtos com base na lignina, atualmente o foco dos estudos tem se voltado para o uso desse material como fonte de energia para os processos, o que garantiria a auto-suficiência e, eventualmente, até a possibilidade de exportar alguma energia elétrica excedente. Naturalmente, essa situação é

positiva tanto para a viabilidade econômica da tecnologia quanto para os quesitos ambientais, já que reduziria a dependência por recursos energéticos fósseis externos (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

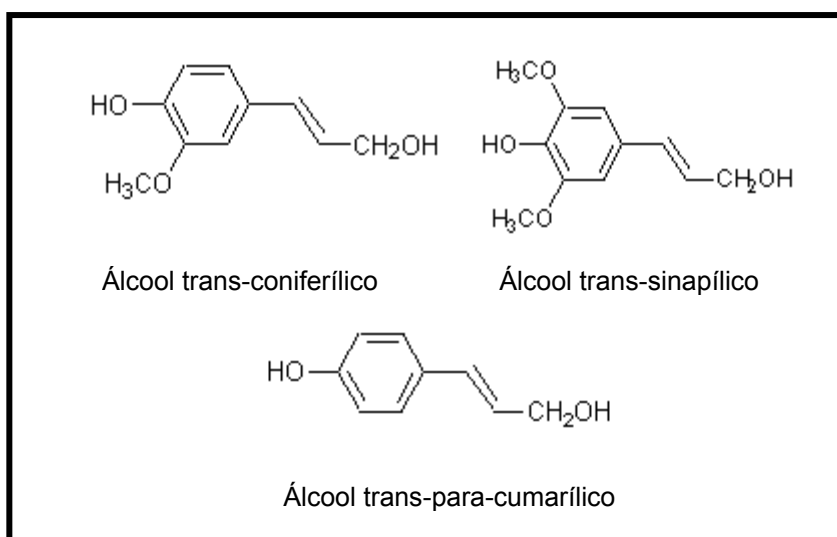


Figura 2.4. Precursores primários da lignina (D'ALMEIDA, 1988)

2.1.4. Pré-tratamentos

A conversão da maioria dos materiais lignocelulósicos a álcool a partir da celulose requer pré-tratamento antes da hidrólise deste polissacarídeo ser realizada. O objetivo do pré-tratamento é remover a hemicelulose e a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais; além disso, deve evitar a degradação ou perda de carboidratos e a formação de bioprodutos que possam inibir os microorganismos fermentadores. Existem diversos tipos de pré-tratamentos, com diferentes rendimentos e efeitos distintos sobre a biomassa e conseqüente impacto nas etapas subseqüentes. Dentre os vários métodos de pré-tratamento, os mais comumente utilizados são pirólise, *Steam explosion*, *Amomnia fiber explosion*, *CO₂ explosion*, ozonólise, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, deslignificação oxidativa e processo Organosolv (SUN & CHENG, 2005).

Apesar do resíduo proveniente do sistema de decantação da indústria de celulose, matéria-prima utilizada neste trabalho, ser composto por celulose, hemicelulose e lignina, não é necessária a submissão desta biomassa a etapas de pré-tratamentos antes da realização da hidrólise da celulose, uma vez que no seu

processo de origem, é realizada a deslignificação das polpas, permitindo a remoção da maior parte da lignina e da hemicelulose. Esta importante característica coloca este resíduo numa posição altamente promissora e competitiva com os outros resíduos agroflorestais lignocelulósicos para a produção de bioetanol de segunda geração, em virtude das etapas de pré-tratamentos representarem custos adicionais na produção deste biocombustível.

2.1.5. A celulose no contexto de biorrefinaria

O termo biorrefinaria é relativamente novo, referindo-se ao uso das biomassas e seus resíduos, portanto matérias-primas de fontes renováveis, de forma integrada e diversificada para a produção de combustíveis, produtos químicos, energia e outros materiais de interesse no mercado industrial, com a geração mínima de resíduos e emissões de gases nocivos. O conceito de biorrefinaria é análogo ao das atuais refinarias de petróleo, as quais produzem uma variedade de combustíveis e produtos químicos a partir do petróleo in natura (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

A utilização de biomassas lignocelulósicas dentro do contexto de biorrefinaria é baseada em duas diferentes plataformas: a plataforma bioquímica, que emprega processos biológicos na conversão dos açúcares extraídos das biomassas por processos de hidrólise; e a plataforma termoquímica, cujo conceito já está inferido no nome, que emprega processos termoquímicos para a conversão de biomassas na presença ou ausência de O₂ (PERVAIZ & CORREA, 2009).

Dentro do contexto da plataforma bioquímica, tanto os monômeros da celulose quanto os da hemicelulose, podem ser utilizados como blocos de construção de diferentes e diversos produtos. A partir da hidrólise total da celulose, obtêm-se somente glicose, que devido a existência de uma via metabólica comum e exclusiva na maioria dos seres vivos, pode ser biologicamente convertida em bioetanol, ácidos orgânicos, glicerol, sorbitol, manitol, frutose, enzimas, polímeros, entre outras substâncias. A glicose pode ser ainda convertida quimicamente ou enzimaticamente em hidroximetilfurfural, que é um importante intermediário para a produção de dimetilfurfural (DMF). O bioetanol por sua vez, foco deste presente trabalho, pode ter inúmeras aplicações, dentre elas: como combustível veicular ou

aditivo de combustível; empregado na produção de moléculas como butadieno, ésteres e etileno; aplicado na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

A Figura 2.5 mostra esquematicamente as substâncias que podem ser produzidas a partir da glicose proveniente da celulose.

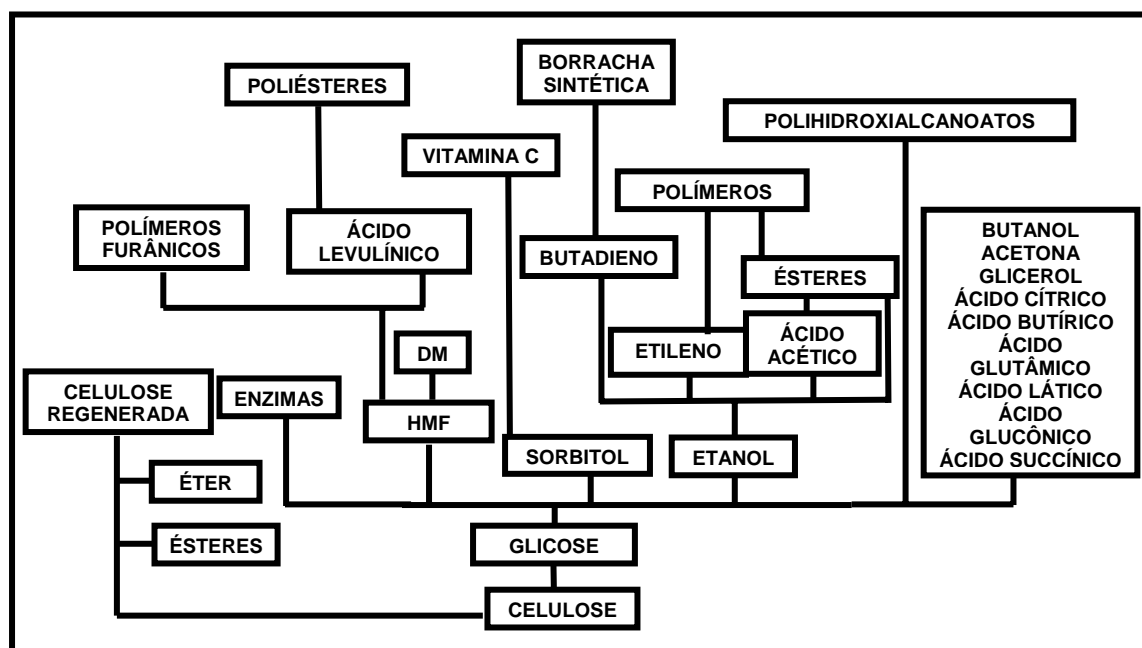


Figura 2.5. Biorrefinaria de matérias-primas lignocelulósicas: produtos da celulose (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008)

Entretanto, para que tais substâncias possam ser produzidas a partir da glicose da celulose, faz-se necessário hidrolisar este polissacarídeo a fim de disponibilizar seus monômeros para os processos posteriores.

2.1.6. Hidrólise enzimática da celulose

A hidrólise enzimática da celulose é catalisada por enzimas altamente específicas que são chamadas de celulases; na realidade, trata-se de um complexo enzimático composto por pelo menos três grandes grupos de celulases: endoglucanases, que clivam randomicamente as ligações internas da região amorfa, liberando oligossacarídeos com terminações redutoras e não redutoras livres; exoglucanases, subdivididas em celobiohidrolases, que são responsáveis pela hidrólise dos terminais redutores (CBHs do tipo I) e não redutores (CBHs do tipo II),

e glucanohidrolases (GHs), que são capazes de liberar moléculas de glicose diretamente dos terminais do polímero; e β -glucosidases, que hidrolisam a celobiose e oligossacarídeos solúveis de baixo grau de polimerização (menor que 7) a glicose. As enzimas do complexo celulásico sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (ARANTES & SADDLER, 2010).

Individualmente, as enzimas do complexo celulásico não hidrolisam a celulose de maneira eficiente, sendo necessária uma ação complementar e sinérgica, ou seja, uma ação em conjunto para que o rendimento das celulases quando atuam simultaneamente seja melhor do que a soma dos rendimentos individuais. São conhecidas pelo menos três formas de sinergia (LYND *et al.*, 2002):

- **Sinergia endo-exo:** as endoglucanases atuam nas regiões amorfas, liberando terminais redutores e não redutores, nos quais atuarão as CBHs do tipo I e do tipo II, respectivamente.
- **Sinergia exo-exo:** as CBHs I e CBHs II atuam simultaneamente nos terminais redutores e não redutores liberados pelas endoglucanases.
- **Sinergia exo-BG e endo-BG:** as exoglucanases e endoglucanases liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos da β -glucosidase.

Durante a hidrólise de substratos solúveis, ocorrem basicamente os seguintes fenômenos: a adsorção das celulases aos sítios disponíveis no substrato celulósico; formação de um complexo ativo celulases-substrato; hidrólise das ligações glicosídicas do polímero celulósico; e dessorção do complexo celulásico do substrato hidrolisado (ZHANG & LYND, 2004).

Muitos fatores podem afetar a hidrólise enzimática da celulose, como por exemplo, a concentração de substrato, a atividade da celulase e as condições da reação (temperatura, pH, bem como outros parâmetros). Para melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise, é necessário otimizar o processo e reforçar a atividade das celulases (SUN & CHENG, 2002).

Quando comparada com a hidrólise ácida, a hidrólise enzimática da celulose geralmente é conduzida em condições mais brandas (pH 4,8 e temperatura entre 45° e 50°C), não causa problemas de corrosão e permite maiores rendimentos

(75%- 85%), além de possibilitar a fermentação simultânea à sacarificação (processo SSF - *Simultaneous Saccharification and Fermentation*) que será discutido posteriormente. Devido seu grande potencial de evolução, muitos especialistas vêem a hidrólise enzimática como a chave para a produção de bioetanol de segunda geração a um custo competitivo em longo prazo (PHILIPPIDIS & SMITH, 1995; LYND *et al.*, 2002).

Tanto as bactérias como os fungos (aeróbios ou anaeróbios, mesófilos ou termófilos) podem produzir celulasas que hidrolisam materiais lignocelulósicos. Dentre as bactérias, as espécies *Cellulomonas fimi* e *Thermomonospora fusca* são as mais estudadas para a produção de celulasas. Dentre os fungos que produzem celulasas, estão *Sclerotium rolfisii*, *Phanerochaete chrysosporium* e os dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Schizophyllum*. De todos estes gêneros, *Trichoderma* tem sido o mais amplamente estudado para a produção de celulasas (DUFF & MURRAY, 1996).

2.2. A INDÚSTRIA DE CELULOSE

As primeiras matérias-primas usadas na fabricação de celulose em escala industrial foram as madeiras do pinheiro e do abeto das florestas das zonas frias do norte da Europa e América do Norte. Outras espécies - o vidoeiro, a faia e o choupo preto nos Estados Unidos e Europa, o pinheiro no Chile e Nova Zelândia e o eucalipto no Brasil, Espanha, Portugal, Chile e África do Sul - são utilizadas na indústria de celulose. Praticamente qualquer árvore pode ser utilizada para produzir celulose. Cada espécie produz fibras de celulose com características específicas, o que confere ao papel propriedades especiais (CAMPOS, 1997).

Atualmente, a produção de celulose baseia-se principalmente em florestas plantadas, embora alguns países asiáticos, europeus e a América do Norte ainda utilizem florestas nativas. O Brasil utiliza essencialmente espécies de eucalipto de florestas plantadas, localizadas principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Bahia, Pará e Maranhão (BRACELPA, 2010).

Eucalipto (do grego, *eu* + *καλύπτω* = "verdadeira cobertura") é a designação vulgar das várias espécies vegetais do gênero *Eucalyptus*, ainda que o nome se aplique a outros gêneros de mirtáceas. O gênero inclui mais de 700 espécies, quase todas originárias da Austrália, e se adapta a praticamente todas as condições climáticas (BINKLEY *et al.*, 2003).

O eucalipto oferece diversas vantagens em comparação a outras espécies florestais utilizadas no mundo para a produção de celulose, inclusive as nativas. Graças ao clima favorável do Brasil e ao avanço alcançado em pesquisa e tecnologia florestal, o eucalipto apresenta o menor ciclo de crescimento quando comparado com outras árvores, podendo ser colhido em apenas 7 anos para a produção de celulose, quando atinge até 35 metros de altura (Tabela 2.3). Também é utilizado para extração de óleos essenciais com os quais são fabricados produtos de limpeza, alimentícios, perfumes e remédios. E com a madeira, tradicionalmente, são produzidas tábuas, sarrafos, lambris, ripas, vigas e postes, entre outros (BRACELPA, 2010).

Tabela 2.3. Comparação de rotação e rendimento de árvores

Árvore	País	Rotação (anos)	Rendimento (m ³ /ha ano)
Eucalipto	Brasil	7	41
Eucalipto	África do Sul	8-10	20
Eucalipto	Chile	10-12	30
Eucalipto	Portugal	12-15	12
Eucalipto	Espanha	12-15	10
Bétula	Suécia, Finlândia	35-40	4
Pinus spp	Brasil	15	35
<i>Pinus radiata</i>	Chile	25	22
<i>Pinus radiata</i>	Nova Zelândia	25	22
<i>Pinus elliotii</i>	EUA	25	10
Pinus de Oregon	Canadá (costa)	45	7
<i>Picea abies</i>	Suécia, Finlândia	70-80	4
<i>Picea glauca</i>	Canadá	55	3
<i>Picea mariana</i>	Canadá (leste)	90	2

Fonte: BRACELPA (2010)

No começo, a celulose de eucalipto era vista como fibra secundária, de menor valor. Mas, gradativamente, passou a ser muito requisitada pela indústria papelreira, em função das características únicas da fibra (FORRESTER *et al.*, 2006).

A fibra de eucalipto trata-se de uma fibra rígida e curta. Na verdade, é a fibra mais curta entre as espécies de madeira dura no mundo e seu comprimento médio pode chegar a apenas 0,65 mm. As fibras da bétula, do choupo, da faia e do carvalho são 15% a 40% maiores. E as fibras das coníferas medem muito mais que o mínimo de 2 mm. Além disso, é a fibra de menor granulação dentre aquelas mais comumente encontradas no mercado de celulose. A granulação é igual ao peso da fibra dividido por seu comprimento (STAPE *et al.*, 2010).

Como sua fibra é curta e de baixa granulação, o eucalipto apresenta um número alto de fibras por grama, sendo comumente encontrados valores na faixa de 20 milhões. A título de exemplo, o pinheiro do sul dos Estados Unidos está no extremo oposto, com 1 milhão de fibras por grama. As propriedades especialíssimas de suas fibras tornam a pasta celulósica do eucalipto a melhor matéria-prima para a maioria dos tipos de papel. Quando devidamente processada, a pasta de celulose de eucalipto alcança todas as exigências de alta qualidade, agregando mais valor ao produto final (ARACRUZ, 2009).

As florestas plantadas de eucalipto visam à garantia do suprimento de matéria-prima para as indústrias de papel e celulose, siderurgia a carvão vegetal, lenha, serrados, compensados e lâminas e painéis reconstituídos (aglomerados, chapas de fibras e MDF) (LOPES, 1998).

No Brasil, para o cultivo do eucalipto existem duas regiões em termos climáticos: tropical e subtropical. A região sudeste, predominantemente tropical, concentra a maior área de plantio. A localização do plantio e o comportamento da espécie são os principais parâmetros que delimitam o uso de eucalipto. Na Tabela 2.4 algumas espécies de eucalipto são caracterizadas, indicando o uso de sua madeira, bem como o seu comportamento no tipo de área agrícola em que é plantada (EMBRAPA, 2007).

O Setor Florestal Brasileiro conta com, aproximadamente, 530 milhões de hectares de florestas nativas, 43,5 milhões de hectares em Unidades de Conservação Federal e 4,8 milhões de hectares de florestas plantadas com

eucalipto, pinus e acácia-negra. As atividades florestais no Brasil geram mais de 2 milhões de empregos, contribuindo com mais de 20 bilhões de dólares para o PIB (Produto Interno Bruto), exportando mais de US\$ 4 bilhões (8% do agronegócio) e contribuindo com 3 bilhões de dólares em impostos por ano, arrecadados de 60.000 empresas (BRACELPA, 2010).

Tabela 2.4. Caracterização de espécies de eucalipto

Espécie de eucalipto	Localização da propriedade agrícola	Uso da madeira	Comportamento da espécie
<i>E. dunnii</i>	Em regiões sujeitas a geadas severas e freqüentes	Fins energéticos (fonte de energia ou carvão vegetal) e serraria	Apresenta rápido crescimento e dificuldade na produção de sementes
<i>E. benthamii</i>	Em regiões sujeitas a geadas severas e freqüentes	Fins energéticos (fonte de energia ou carvão vegetal)	Boa forma do fuste, intensa rebrota, fácil produção de sementes e requer volume alto de precipitação pluviométrica anual
<i>E. grandis</i>	Em regiões livres de geadas severas	Fins energéticos (fonte de energia ou carvão vegetal), celulose de fibra curta, construções civis e serraria	Maior crescimento e rendimento volumétrico das espécies e aumenta a qualidade da madeira com a duração do ciclo
<i>E. urophylla</i>	Em regiões livres de geadas severas	Uso geral	Crescimento menor que <i>E. grandis</i> e boa regeneração por brotação das cepas
<i>E. saligna</i>	Em regiões livres de geadas severas	Fins energéticos, móveis, estruturas, caixotaria, postes, escoras, mourões, celulose	Madeira mais densa que <i>E. grandis</i> e menos suscetível à deficiência de Boro
<i>E. camaldulensis</i>	Em regiões livres de geadas severas	Fins energéticos, serraria, postes, dormentes, mourões, construções	Árvores recomendadas para regiões de déficit hídrico anual elevado
<i>E. cloeziana</i>	Em regiões livres de geadas severas	Fins energéticos (fonte de energia ou carvão vegetal), construções civis e uso rural	Excelente forma do fuste, durabilidade natural e alta resistência a insetos e fungos

Fonte: EMBRAPA (2007)

2.2.1. Produção de celulose

Para produção de papel utiliza-se como matéria-prima a pasta de celulose, que por sua vez é produzida a partir da madeira. As etapas da produção de madeira constituem-se basicamente na produção de mudas e no plantio destas, que pode ser mecanizado, manual ou semi mecanizado. Em seguida, as árvores são colhidas

para que a madeira seja disponibilizada para a produção de celulose. A produção de celulose constitui-se de quatro etapas: picagem, polpação, branqueamento e secagem, as quais serão descritas a seguir (Figura 2.6) (ARACRUZ, 2009).

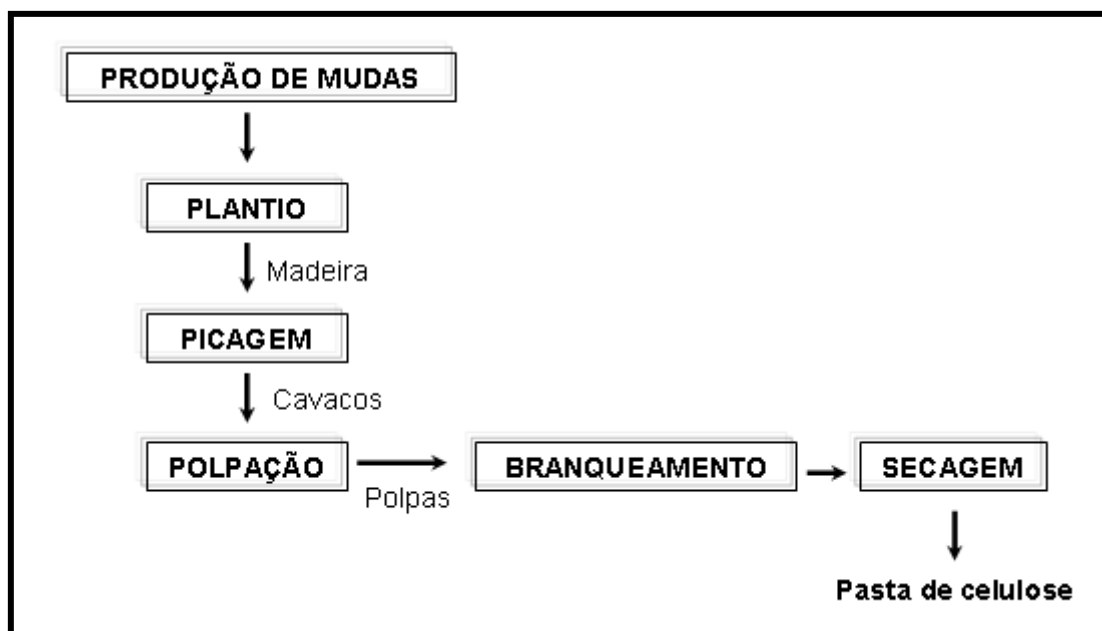


Figura 2.6. Fluxograma de blocos da produção da pasta de celulose
Elaborado com base em ROSA (2003)

Picagem

Na etapa de picagem, a madeira chega como toras, com 5,5 m de comprimento e diâmetro variando entre 7 cm e 40 cm. Estas toras são armazenadas em pátios e depois enviadas a um descascador, sendo a casca posteriormente queimada para geração de energia. As toras descascadas seguem através de esteiras até o picador, onde são cortadas em pedaços pequenos chamados cavacos. Os cavacos são peneirados de forma que fiquem dentro de uma faixa de diâmetro estabelecida, retirando lascas e finos, e transportados por correias até os digestores, onde se inicia o processo de polpação (ARACRUZ, 2009).

Polpação

Para produzir a polpa, os cavacos são submetidos às seguintes etapas: cozimento; depuração e lavagem; deslignificação e lavagem; e estocagem (LOPES, 1998).

- **Cozimento:** o objetivo do cozimento dos cavacos é separar a lignina, extrativos e outros materiais não celulósicos, responsáveis pela união das fibras de celulose. Durante este processo os cavacos são colocados em autoclaves, chamados de cozinhadores ou digestores, onde são tratados com produtos químicos (licor de cozimento, NaOH, Na₂S) e submetidos à temperatura, pressão e tempos variáveis – dependendo do produto final desejado – até que se consiga a dissolução do maior grau possível do material não celulósico.
- **Depuração e lavagem:** o objetivo da depuração é separar os materiais não cozidos, como impurezas, areia, nós e palitos. Em seguida, realiza-se a lavagem para separar as fibras (liberadas durante o processo de cozimento) das substâncias extraídas da madeira (dissolvidos durante o cozimento) e dos materiais químicos (licor de cozimento).
- **Deslignificação e lavagem:** o objetivo da deslignificação é a dissolução da lignina residual através de um tratamento com oxigênio. A seguir a lignina é retirada da massa celulósica através de uma segunda lavagem, resultando numa polpa pré-branqueada.
- **Estocagem:** a celulose pré-branqueada é armazenada na torre de estocagem e encaminhada ao processo de branqueamento ou diretamente para as unidades de secagem e/ou máquinas de papel.

Branqueamento

O objetivo do branqueamento é melhorar as propriedades óticas da pasta celulósica (brancura, alvura, opacidade e estabilidade da pasta). É um processo físico-químico no qual são removidos os derivados da lignina (remanescentes na pasta celulósica após o processo de polpação) e adicionados produtos que modificam quimicamente as substâncias existentes na pasta, descolorando-a. Após este processo a pasta está pronta para ser enviada para as máquinas de papel e/ou unidades de secagem. Neste processo, a polpa é tratada com químicos, como peróxido de hidrogênio, dióxido de cloro, oxigênio e soda cáustica contendo cloro, que propiciam o clareamento da polpa até o grau requerido pela indústria, o que depende da finalidade que a pasta de celulose terá (ROSA, 2003).

Secagem

Após o branqueamento, a celulose é enviada para a secagem. Nesta operação a água é retirada da celulose, até que esta atinja o ponto de equilíbrio com a umidade relativa do ambiente (90% de fibras e 10% de água), obtendo-se assim a pasta de celulose pronta para venda e uso na produção de papel (LOPES, 1998).

2.2.2. Resíduos gerados na produção de celulose

Dentre os resíduos da indústria de celulose, estão os resíduos da madeira, provenientes do descascamento e picagem das toras e do peneiramento dos cavacos; resíduos do digestor, como alcali ativo, licor negro e inúmeros insumos químicos; resíduos celulósicos do sistema de decantação, oriundos da etapa de polpação e branqueamento; e resíduos de outras etapas, como resíduos florestais, lama de cal, ClO_2 , lodo biológico e cinza. Estima-se que para cada 100 toneladas de celulose produzida, 48 toneladas de resíduos sejam geradas (PEDRAZI, 2005).

As alternativas possíveis para a destinação dos resíduos de madeira são a compostagem, produção de energia, uso como lenha e carvão vegetal, produção de painéis etc. Atualmente, a empresa Aracruz Celulose gera, aproximadamente, 165 mil ton/ano de casca (55% umidade) e 90 mil ton./ano de cavacos residuais (45% umidade). Com esses resíduos, gera-se em média, 2,6 toneladas de vapor/ tonelada de biomassa seca e a média de geração de energia elétrica é de 8 toneladas vapor/ MW. O excedente de energia é vendido, bem como o excedente de biomassa. Esses valores variam de acordo com o suprimento de biomassa (ARACRUZ, 2009).

Como a madeira do eucalipto é constituída de elementos anatômicos dos quais os mais importantes são as fibras, quando são gerados resíduos fibrosos, perde-se um material valioso rico em celulose. Essa perda implica no aumento dos custos, não só pela perda de matéria-prima, mas também por ter mais um resíduo a ser manuseado, transportado e disposto. Por essa razão, gerar resíduos sólidos fibrosos em fábricas de celulose é um grande problema (PEDRAZI, 2005).

Em relação ao licor negro que sai do digestor, grande parte das fábricas produzem energia a partir de sua queima e/ou o reutilizam no processo após um tratamento que o converte novamente em licor branco, que é utilizado no cozimento.

Desta maneira, as fábricas reduzem a quantidade de licor negro liberado nos efluentes líquidos. Os rejeitos do digestor são resíduos problemáticos, pois possuem alcalinidade ativa, pH alto, lixiviam líquido escuro, e com isso, possuem impacto ambiental substancial (ARACRUZ, 2009).

Em relação aos resíduos celulósicos do sistema de decantação, são gerados nas diferentes etapas do processo, como depuração, deslignificação e branqueamento. Estes resíduos são ricos em fibras celulósicas e quando vão para os efluentes, causam problemas de sólidos suspensos e de DQO (Demanda Química de Oxigênio) elevados. Essas fibras ou exigirão grandes decantadores para a sua remoção como lodo, ou irão para os cursos d'água causando inúmeros problemas de poluição. Se forem despejadas nos rios, podem se acomodar nas guelras dos peixes, causando sua mortandade, e/ou acumular-se na forma de sedimentos nos fundos dos rios, podendo sofrer fermentações que geram odor desagradável (LOPES, 1998).

Este resíduo celulósico é gerado juntamente com outros resíduos, como o licor negro e insumos químicos residuais do digestor, que são coletados e encaminhados para tubulações únicas que os levam para os decantadores, equipamentos situados no final do processo, onde o efluente líquido é separado dos sólidos. Atualmente, a empresa Aracruz Celulose produz, aproximadamente, 30 mil toneladas/ano destes resíduos celulósicos, que são clarificados e aproveitados como subprodutos, por exemplo, na produção de embalagens, caixas (por exemplo, caixa de ovos), suportes, papéis higiênicos, capa de caderno, etc. (ARACRUZ, 2009).

Por ser esse resíduo fibroso uma biomassa, portanto composto majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, o mesmo pode ser aproveitado na produção de inúmeros produtos de interesse industrial que podem conferir um valor agregado muito maior. Dentre esses produtos, encontram-se polímeros, ácidos (acético, succínico, urônico, etc.), monossacarídeos, fenol, xilitol, sorbitol, combustível líquido, como o etanol, e produtos químicos em geral. Assim, pode-se translocar essa biomassa de sua posição de resíduo para a posição de matéria-prima, excluindo assim, um componente do cenário de resíduos gerados pelas indústrias (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

Desta maneira, esse resíduo celulósico produzido na indústria de celulose constitui a matéria-prima de interesse deste trabalho para a produção de bioetanol

como combustível veicular. Baseado neste propósito faz-se necessário submeter o citado resíduo à hidrólise enzimática, a fim de disponibilizar seus monômeros de glicose para serem utilizados pelos microorganismos fermentadores.

2.2.3. Aspectos econômicos da indústria de celulose

A indústria brasileira de celulose encerrou 2009 com a produção de 13,5 milhões de toneladas de celulose, aumentando 6% em relação a 2008 (Figura 2.7), quando o Brasil ocupou a quarta posição no ranking dos maiores produtores mundiais de celulose (Tabela 2.5). Em relação à exportação brasileira de celulose em 2009, 8,2 milhões de toneladas foram destinadas ao mercado externo, principalmente para os países europeus (46%) (Figura 2.8) (BRACELPA, 2010).

O setor de celulose, juntamente com o setor de papel, é formado por 220 empresas instaladas em 450 municípios de 17 estados brasileiros, mantendo 110 mil empregos diretos (65 mil nas atividades industriais e 45 mil pessoas dedicadas à área florestal). O faturamento do setor de celulose e papel em 2009 foi de 28,4 bilhões de reais e foi responsável pela arrecadação de 2,1 bilhões de reais de impostos (BRACELPA, 2010).

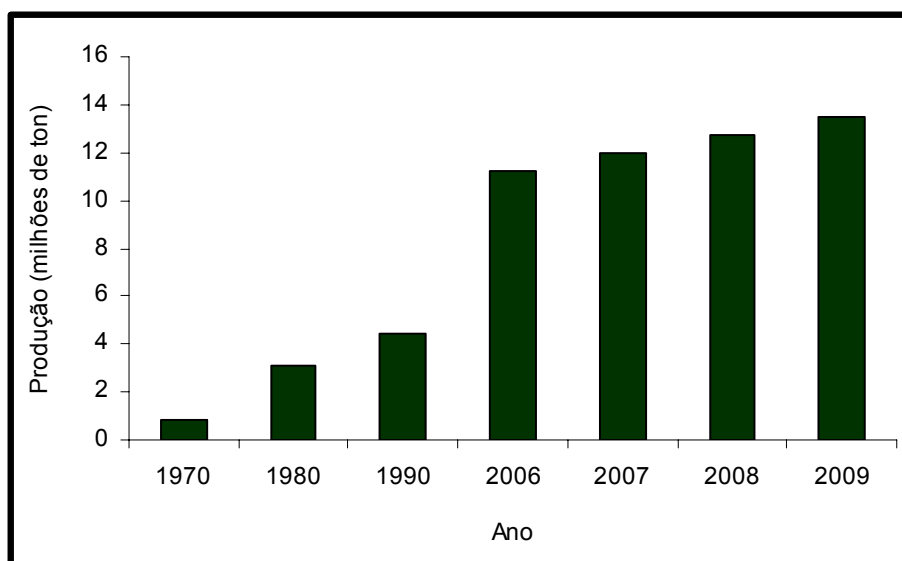
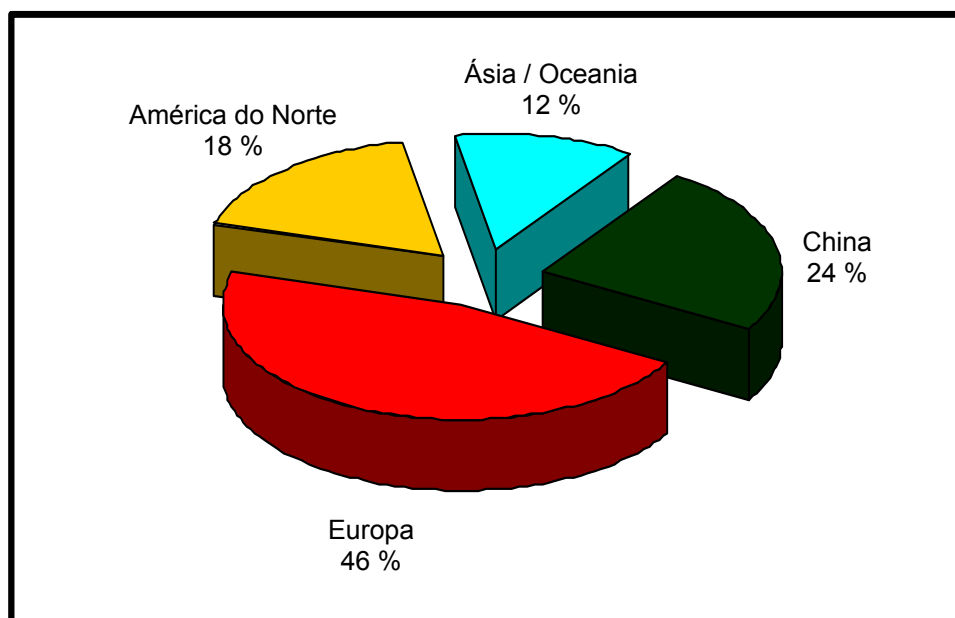


Figura 2.7. Evolução da produção brasileira de celulose
Elaborado com base em BRACELPA (2010)

Tabela 2.5. Maiores produtos mundiais de celulose em 2008

País	Produção (mil tonelada)
1. EUA	51.479
2. China	21.477
3. Canadá	20.299
4. Brasil	12.697
5. Suécia	12.071
6. Finlândia	11.720
7. Japão	10.670
8. Rússia	7.430
9. Indonésia	6.435
10. Chile	4.985
11. Índia	3.662
12. Alemanha	2.902
Demais	26.591
Total	192.418

Elaborada com base em BRACELPA (2010)

**Figura 2.8.** Destinos das exportações brasileiras de celulose (BRACELPA, 2010)

2.3. O BIOETANOL NO CONTEXTO DE 2ª GERAÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

2.3.1. Dimensões técnicas e ambientais do uso de bioetanol como combustível veicular

Qualquer que seja sua origem – biomassa ou processos petroquímicos e carboquímicos –, o etanol é um combustível, ou seja, libera significativas quantidades de calor ao se queimar. Contudo, o etanol apresenta algumas diferenças importantes em relação aos combustíveis convencionais derivados de petróleo. A principal delas é o elevado teor de oxigênio, que constitui 35% em massa do etanol. As características do etanol possibilitam a combustão mais limpa e o melhor desempenho dos motores, contribuindo para a redução das emissões poluidoras. Além disso, comporta-se como um verdadeiro aditivo para a gasolina (GOLDEMBERG *et al.*, 2008). Na Tabela 2.6 estão sintetizadas as principais características do etanol e de uma gasolina típica.

Tabela 2.6. Propriedades da gasolina e do bioetanol

Parâmetro	Unidade	Gasolina	Etanol
Poder calorífico	kJ/kg	43.500	28.225
	kJ/litro	32.180	22.350
Densidade	kg/litro	0,72 – 0,78	0,792
Octanagem RON (<i>Research Octane Number</i>)	—	90 – 100	102 – 130
Octanagem MON (<i>Motor Octane Number</i>)	—	80 – 92	89 – 96
Calor latente de vaporização	kJ/kg	330 – 400	842 – 930
Relação ar/combustível estequiométrica	—	14,5	9,0
Pressão de vapor	KPa	40 – 65	15 – 17
Temperatura de ignição	° C	220	420
Solubilidade em água	% volume	~ 0	100

Fonte: GOLDEMBERG & MACEDO (1994)

O etanol, ou álcool etílico, é uma substância com fórmula molecular C_2H_6O , que pode ser utilizada como combustível em motores de combustão interna com ignição por centelha (ciclo Otto) de duas maneiras: 1) em misturas de gasolina e

etanol anidro; ou 2) como etanol puro, geralmente hidratado (GOLDEMBERG *et al.*, 2008).

Segundo a legislação brasileira, considerando teores em massa, o etanol anidro deve conter menos de 0,6% de água, enquanto para o etanol hidratado, esse teor deve estar entre 6,2 e 7,4%. O etanol hidratado puro deve ser usado em motores fabricados ou adaptados especificamente para esse fim, em particular com a adoção de taxas de compressão mais elevadas, visando utilizar adequadamente a octanagem mais alta do etanol frente à gasolina e obter ganhos de eficiência de 10%. Após décadas de aperfeiçoamento de motores especialmente fabricados para etanol, a tecnologia automotiva está suficientemente desenvolvida para permitir que veículos a etanol puro hidratado tenham desempenho, dirigibilidade, condições de partida a frio e durabilidade absolutamente similares aos motores a gasolina, especialmente em países com invernos moderados (BNDES, 2008).

A partir de 2003 foram lançados comercialmente no Brasil, veículos com os motores flexíveis (*flex-fuel*), capazes de utilizar, sem qualquer interferência do motorista, desde 100% de etanol hidratado até uma gasolina com 20% a 25% de etanol anidro (JOSEPH, 2005).

Como consequência de sua composição, comparativamente às gasolinas típicas, a combustão da gasolina com etanol e do etanol puro em motores produz menores emissões de monóxido de carbono (CO), óxidos de enxofre (SO_x), hidrocarbonetos e outros compostos poluentes (GOLDEMBERG *et al.*, 2008).

Segundo MACEDO *et al.* (2008), só no ano de 2003, emissões equivalente a 27,5 milhões toneladas de CO₂ foram evitadas devido à substituição da gasolina por etanol. E com o consumo de etanol em carros flex brasileiros, entre março de 2003 e janeiro de 2010, evitou-se a emissão de 83,5 milhões de toneladas de gás carbônico na atmosfera (SZWARC, 2010).

Por outro lado, elevam-se as concentrações dos aldeídos (compostos do tipo R-CHO) e dos óxidos de nitrogênio (NO_x). Entretanto, sinaliza-se uma preocupação especial com as emissões de aldeídos associadas ao uso de etanol, pois essas substâncias apresentam potencial cancerígeno e podem se apresentar em teores mais elevados no escapamento dos motores que utilizam etanol do que naqueles a gasolina pura. Todavia, os catalisadores reduzem esses poluentes a níveis

toleráveis, sem agravantes (ABRANTES *et al.*, 2005). A emissão média de aldeídos nos veículos novos brasileiros é de 0,014 g/km para os veículos a etanol e 0,002 g/km para os veículos a gasolina (contendo 22% de etanol anidro), índices inferiores ao atual limite de 0,020 g/km estabelecido pela legislação ambiental brasileira (CONAMA, 2009).

Na Figura 2.9 é apresentada a redução da emissão de gases dos veículos produzidos no Brasil ao longo das décadas de 80 e 90, devido ao desenvolvimento tecnológico dos motores e da introdução do etanol (BNDES, 2008).

Segundo estudos realizados na Austrália, a adoção de 10% de etanol na gasolina permitiu decrescer em 32%, 12% e em mais de 27% as emissões de CO, hidrocarbonetos e aromáticos, respectivamente, reduzindo o risco carcinogênico em 24% (BNDES, 2008). No caso da utilização de etanol anidro, foram possíveis atingir reduções de 57% de CO, 64% de hidrocarbonetos e 13% de NOx (SANTOS *et al.*, 2000).

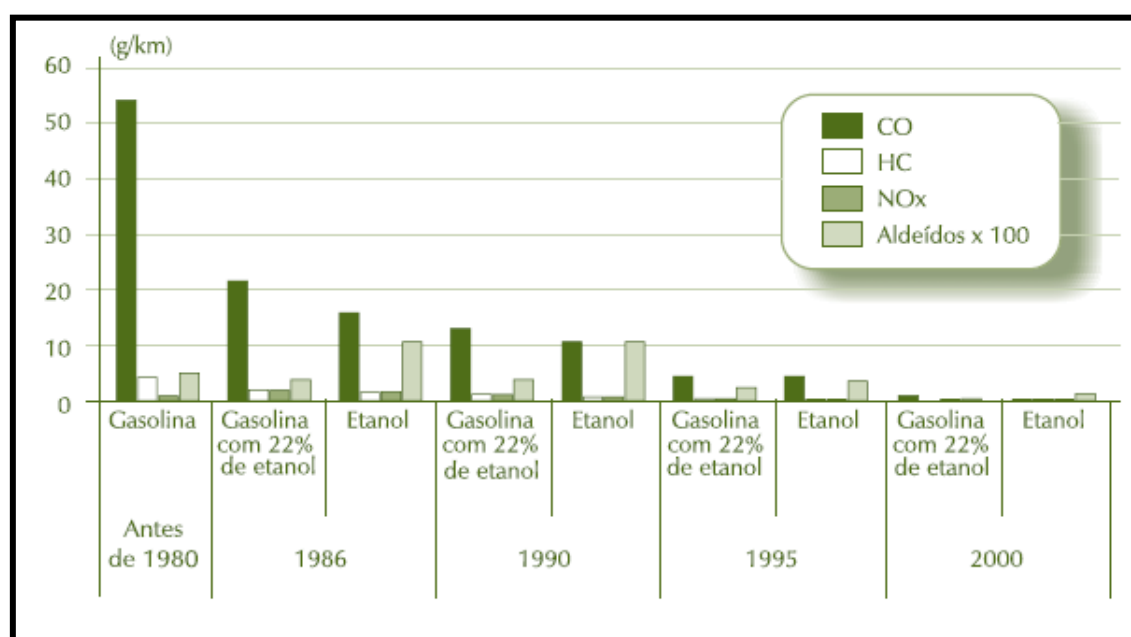


Figura 2.9. Evolução das emissões de gases dos veículos brasileiros (BNDES, 2008)

2.3.2. Evolução do bioetanol combustível no mercado

O desenvolvimento histórico do uso do bioetanol como combustível veicular permitiu que essa alternativa energética se tornasse um componente regular da

matriz energética brasileira. As Figuras 2.10, 2.11 e 2.12 sintetizam bem o processo de expansão da produção de bioetanol durante as últimas décadas. Na Figura 2.10, nota-se como a produção de bioetanol de primeira geração (anidro e hidratado), produzido a partir da cana-de-açúcar, respondeu bem à expansão da demanda desse biocombustível (UNICA, 2009), sinalizada, por sua vez, na Figura 2.11, pela evolução do teor de bioetanol anidro na gasolina desde o início de seu uso (BNDES, 2008), e na Figura 2.12, pelo crescimento da produção de veículos a bioetanol hidratado (ANFAVEA, 2008).

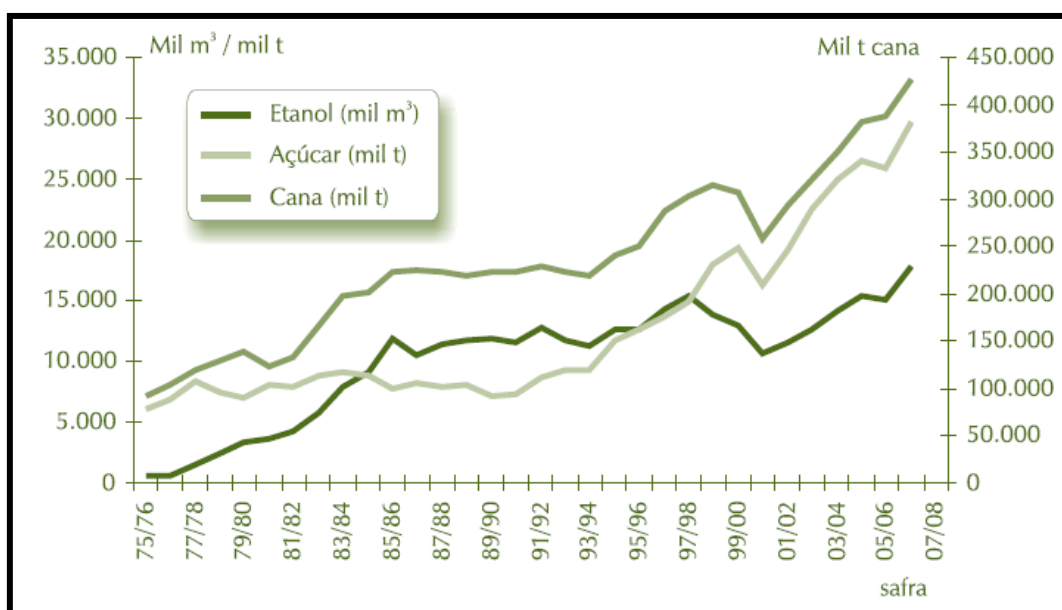


Figura 2.10. Evolução da produção de cana-de-açúcar, etanol e açúcar no Brasil (UNICA, 2009)

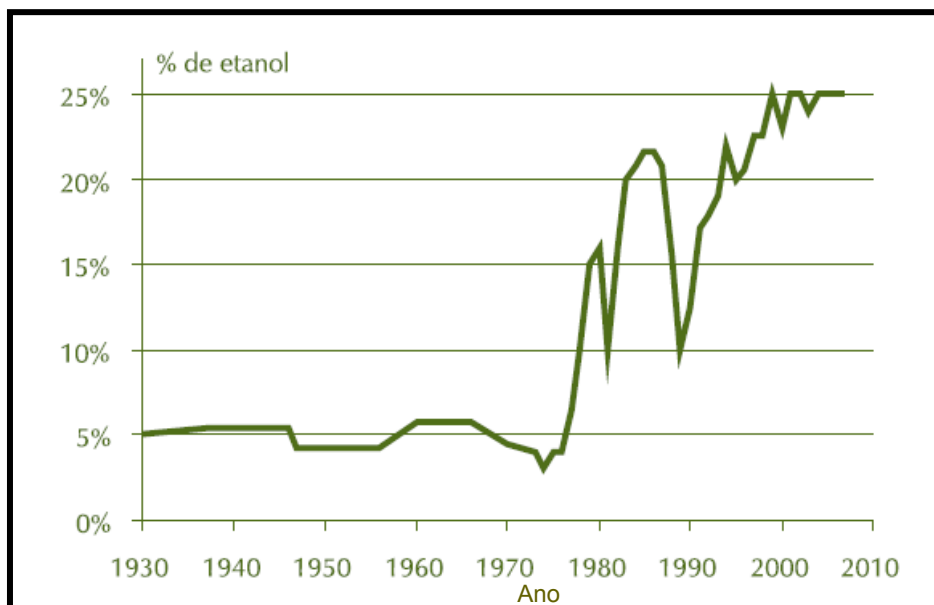


Figura 2.11. Teor médio de etanol anidro na gasolina brasileira (BNDES, 2008)

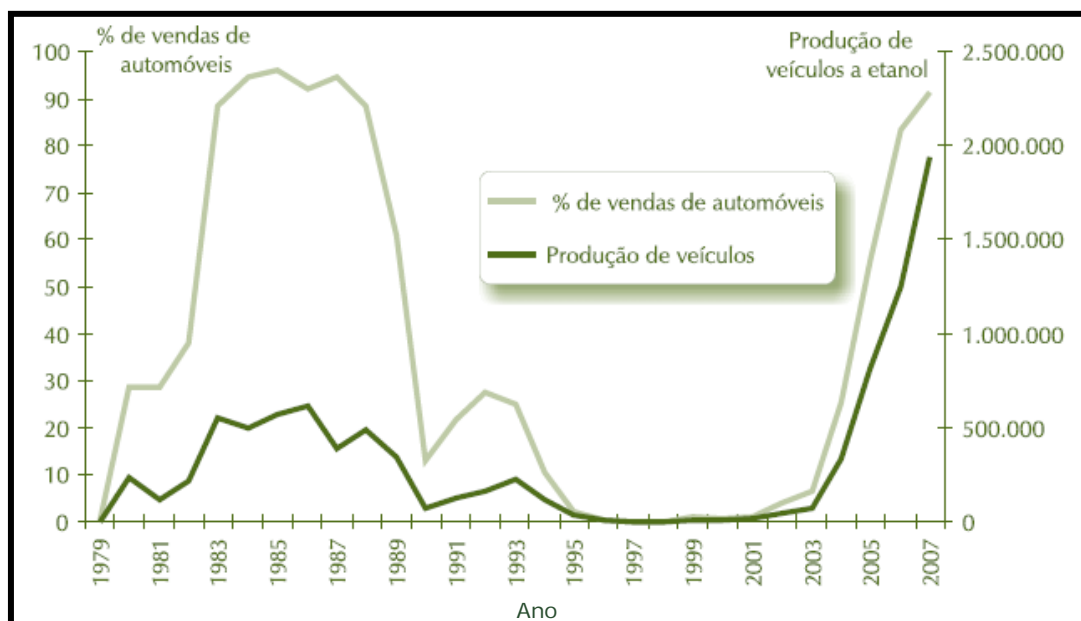


Figura 2.12. Evolução da produção de veículos a etanol hidratado e de sua participação nas vendas de veículos novos (ANFAVEA, 2008)

O aumento da demanda desse biocombustível se manteve mais ou menos constante, apesar do grande estancamento das vendas de veículos a bioetanol hidratado na década de 90. Assim, desde os anos 1970, o bioetanol de primeira geração vem sendo usado regularmente em volumes importantes no Brasil.

Outra forma de avaliar a atratividade do bioetanol frente aos combustíveis convencionais é comparando o preço médio de venda ao consumidor do bioetanol hidratado com o preço praticado para a gasolina comum (Figura 2.13). No caso dos veículos *flexible fuel*, movidos a álcool e/ou a gasolina, o bioetanol é adotado, em geral, até um limite de 70% do preço da gasolina. Nesse contexto, observa-se que, durante a maior parte dos últimos anos, utilizar o bioetanol em vez da gasolina foi mais interessante, exceto durante poucos e curtos períodos quando seu preço elevou-se ao final da safra, porém reduzindo com seu início, como indicado na Figura 2.13 (ANP, 2009).

Baseado em todas as vantagens proporcionadas pelo uso do etanol comparado a gasolina, registrou um grande aumento das vendas desse biocombustível. A Figura 2.14 apresenta as vendas de álcool etílico, incluindo o álcool hidratado e o álcool anidro misturado na gasolina classe C, e de gasolina automotiva, incluindo apenas a da classe A, no Brasil (1999-2008) (ANP, 2009).

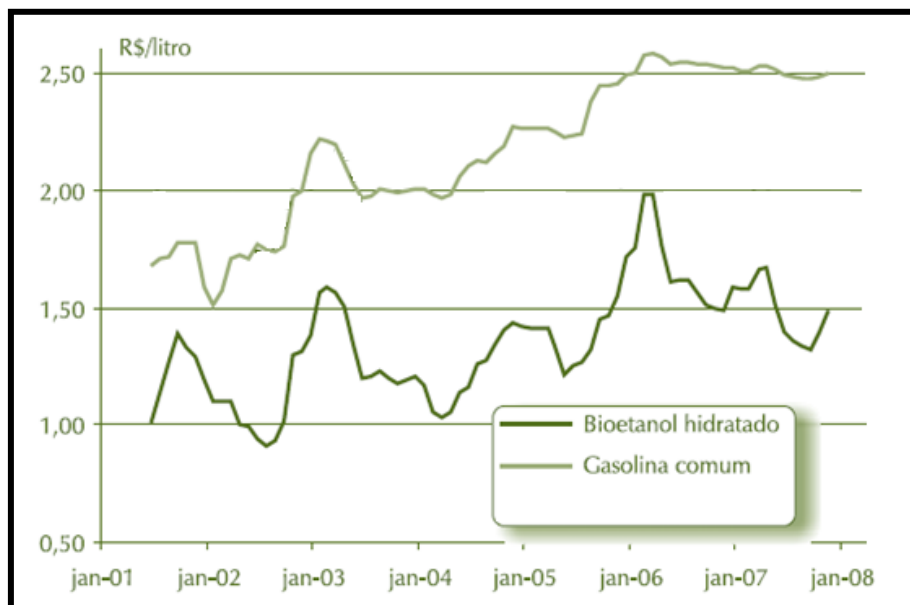


Figura 2.13. Evolução dos preços médios para o consumidor do bioetanol hidratado e da gasolina comum no Brasil (ANP, 2009)

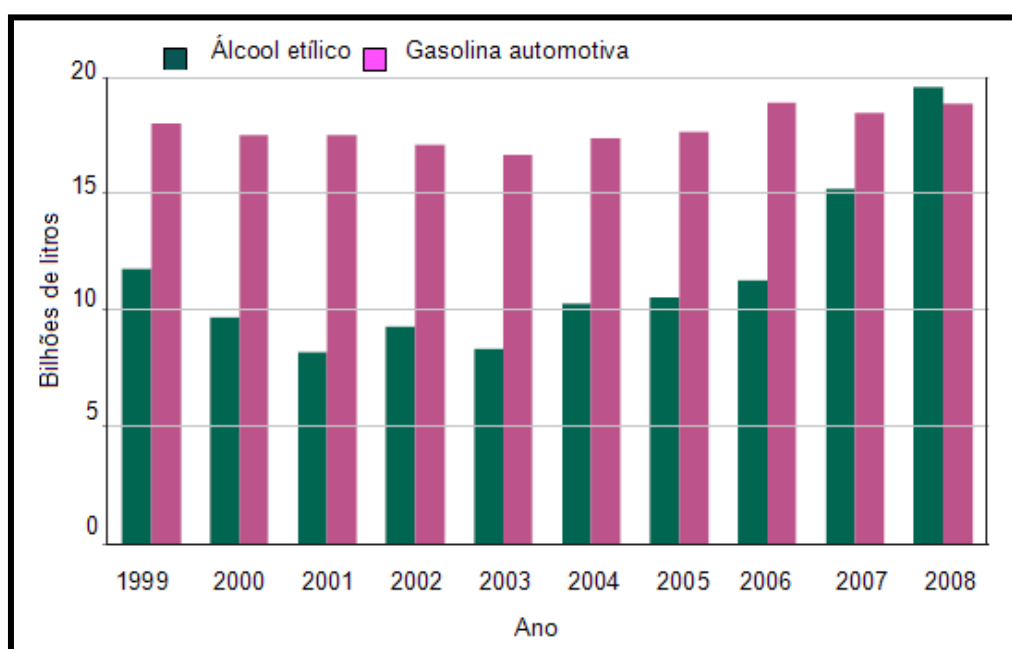


Figura 2.14. Vendas de álcool etílico e de gasolina automotiva no Brasil (ANP, 2009)

Na Figura 2.15 é apresentada a evolução da produção de etanol de primeira geração dos Estados Unidos (EUA), que utiliza o milho como matéria-prima, e do Brasil, a qual foi ultrapassada pela produção estadunidense em 2005. Em 2008, a produção brasileira encerrou em 22,5 bilhões de litros de etanol, contra 34 bilhões de litros produzidos pelos EUA, que ocupou a primeira posição no ranking de produção mundial de etanol, seguido então do Brasil, União Européia (UE) (2,8

bilhões) e China (1,89 bilhões), como pode ser visualizado na Figura 2.16 (MAPA, 2010; RFA, 2010). Segundo o MAPA (2010), a produção de etanol brasileira em 2009 foi 27,7 bilhões de litros e na safra de 2009/2010, posição em 01 de fevereiro deste ano, já é de 25,1 bilhões de litros.

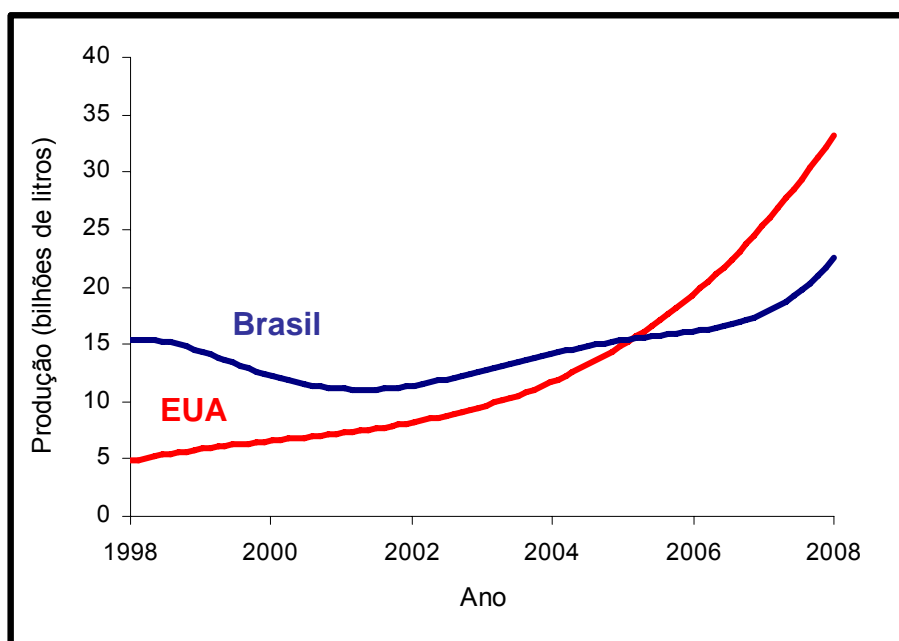


Figura 2.15. Evolução da produção de bioetanol do Brasil e dos EUA
Elaborado com base em MAPA (2010) e RFA (2010)

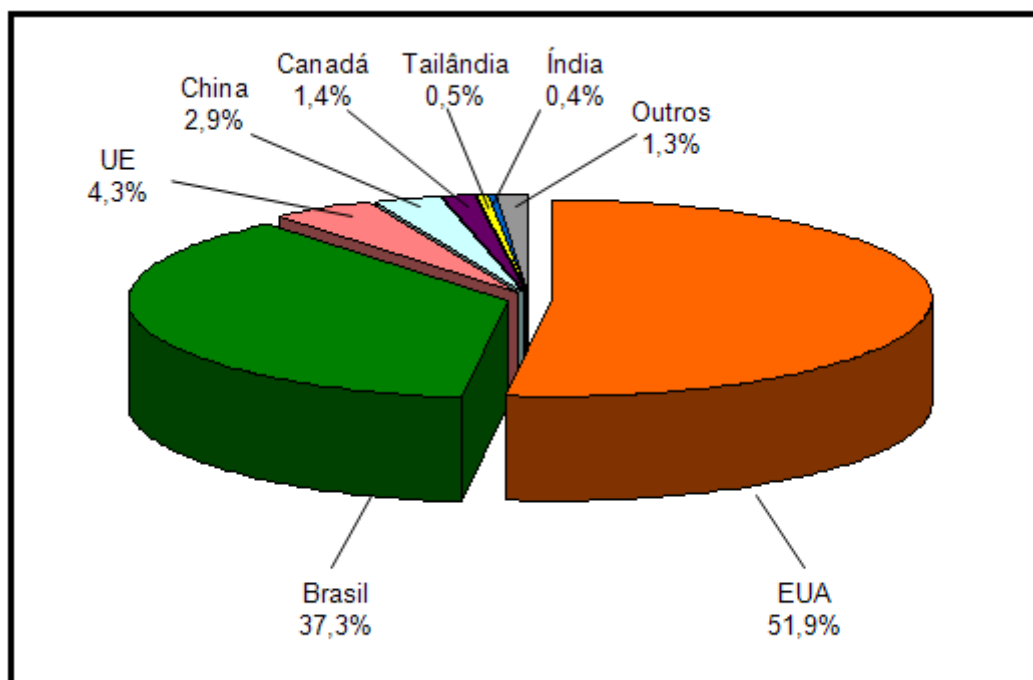


Figura 2.16. Produção mundial de bioetanol combustível em 2008
Elaborado com base em RFA (2010)

Com a crescente produção de bioetanol de primeira geração no Brasil, a área de cultivo de cana-de-açúcar deverá ser expandida para atender à crescente demanda nacional e internacional. Entretanto, para evitar a expansão desmedida das áreas de cultivo, têm-se desenvolvido processos biotecnológicos que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica, abundantemente geradas nos setores agrícolas e florestais, para a produção de bioetanol de segunda geração. Perspectivas norte-americanas mais otimistas afirmam que em 2022 serão produzidos aproximadamente 60 bilhões de litros de biocombustíveis celulósicos ou de segunda geração, como pode ser visualizado na Figura 2.17. De acordo com esta Figura, a produção de biocombustíveis de segunda geração apresentará o maior crescimento quando comparada com o bioetanol de milho, de primeira geração.

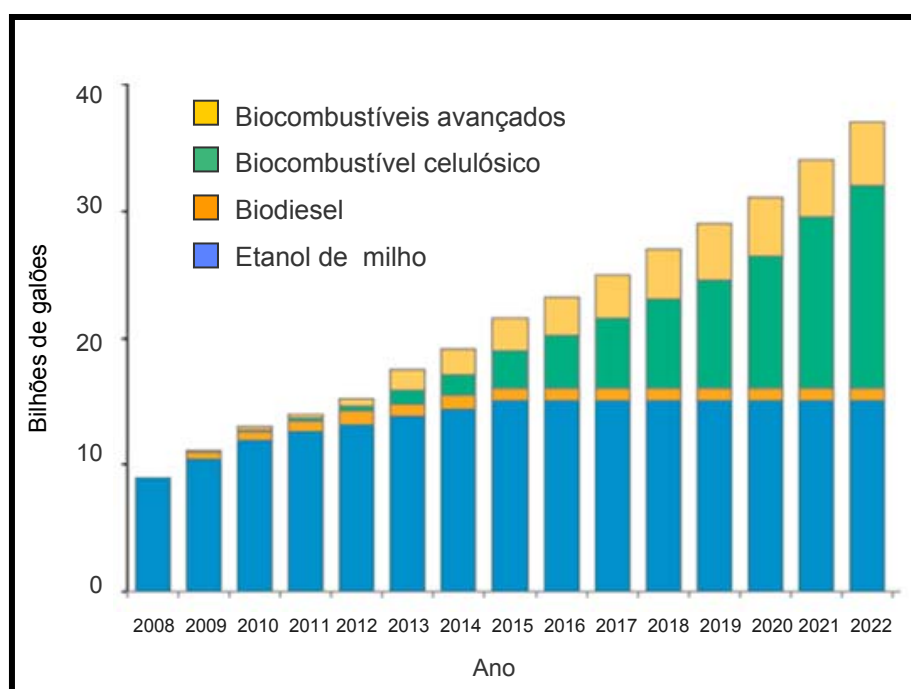


Figura 2.17. Perspectivas da produção de biocombustíveis
Fonte: VERENIUM, 2008

2.3.3. Progresso das ações ambientalistas

Em 1975, o Programa Brasileiro de Álcool (Proálcool) foi criado com o propósito de reduzir as importações de petróleo através da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. A produção de etanol subiu de 0,6 milhões m³, em 1975,

para 18 milhões m³ no período de 2006-2007, com o aumento da produtividade agrícola e industrial (LIMA *et al.*, 2001; BNDES, 2008).

Em 1997, um importante acordo foi realizado na cidade de Kyoto (Japão), que ficou conhecido como Protocolo de Kyoto, no qual foram estabelecidos os mecanismos e limites para a redução das emissões de gases do efeito estufa (GEE) (perfluorcarbono, hexafluoreto de enxofre, metano, óxido nitroso, hidrofluorcarbono e dióxido de carbono) de 5,2% entre 2008 e 2012, em relação aos níveis verificados em 1990 (PEREIRA, 2006).

Se o Protocolo de Kyoto for implementado com sucesso, estima-se que a temperatura global reduza entre 1,4°C e 5,8°C até 2100, entretanto, isto dependerá muito das negociações após o período 2008/2012, pois há comunidades científicas que afirmam categoricamente que a meta de redução de 5% seria insuficiente para a mitigação do aquecimento global (LOUETTE, 2007).

Em 2009, no período de 7 a 18 de dezembro, realizou-se em Copenhague (Dinamarca) a 15ª Conferência das Nações Unidas sobre Mudança do Clima, conhecida como COP 15, reunindo líderes de todo o mundo que pretendiam definir o comportamento dos países para a diminuição do aquecimento global, através de um tratado que ampliasse e prolongasse o Protocolo de Kyoto. Dentre as intenções aprovadas em COP 15, encontram-se a de cada país se empenhar para que o aumento da temperatura do planeta não ultrapasse 2°C e a criação de um fundo de 10 bilhões de dólares por ano até 2012, que ajudará os países pobres a enfrentar problemas de mudanças climáticas (FOLHA ONLINE, 2009).

2.3.4. Produção de bioetanol de segunda geração

Tanto para a produção de etanol de primeira geração, a partir de cana-de-açúcar, quanto de segunda geração, a partir de biomassas de composição lignocelulósica, a via fermentativa é a via mais importante para a obtenção do álcool etílico no Brasil. Um dos fatores que torna a produção de bioetanol por fermentação a forma mais econômica de sua obtenção, é o grande número de matérias-primas naturais e residuais existentes em todo país (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

O microorganismo que mais se emprega na fermentação alcoólica é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, devido à sua capacidade de assimilar facilmente a glicose da cana ou da celulose de biomassas residuais (SÁNCHEZ & CARDONA, 2008).

Dentre as bactérias, a mais promissora é a *Zymomonas mobilis*, que tem alta eficiência energética resultando num alto rendimento de etanol (maior que 90%). Uma das desvantagens do uso desta bactéria na fermentação do caldo de cana e de outros meios com sacarose é a formação de polissacarídeos, que aumenta a viscosidade do meio de fermentação, e de sorbitol, um produto da redução da frutose que diminui a eficiência da conversão de sacarose a etanol (LEE & HUANG, 2000).

A fermentação alcoólica inicia-se com a glicólise, também chamada de *via Embden-Meyerhof*, na qual ocorre a oxidação da glicose em dois ácidos pirúvicos em duas etapas, podendo ocorrer na presença de oxigênio ou não. Na primeira etapa, duas moléculas de ATP são utilizadas enquanto uma molécula de glicose é fosforilada, reestruturada e quebrada em dois compostos de três carbonos: gliceraldeído 3-fosfato (GP) e diidroxiacetona fosfato (DHAP), que é imediatamente convertida em GP. Na segunda etapa, as duas moléculas de GP são oxidadas, em muitos passos, em duas moléculas de ácido pirúvico. Nessas reações, duas moléculas de NAD^+ são reduzidas a NADH e quatro moléculas de ATP (adenosina trifosfato) são formadas pela fosforilação em nível de substrato, com saldo final positivo de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose que é oxidada. Após a glicólise, as duas moléculas de ácido pirúvico são convertidas em duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de CO_2 . As moléculas de acetaldeído são então reduzidas por duas moléculas de NADH para formar duas moléculas de etanol, o produto final da fermentação (Figura 2.18) (TORTORA *et al.*, 2005).

Juntamente com o etanol e o CO_2 , o metabolismo anaeróbico leva também a formação e excreção de glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros), álcoois superiores, acetaldeído, acetoína, butilenoglicol e outros componentes de menor significado quantitativo. Além disso, ocorre simultaneamente o crescimento das leveduras. Estima-se que 5% do açúcar metabolizado pela levedura sejam desviados para gerar tais produtos secundários da fermentação, resultando num rendimento de 95% em etanol; entretanto, em condições industriais,

nas quais fatores químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores), físicos (temperatura, pressão osmótica) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração do microorganismo, contaminação bacteriana) afetam a levedura, rendimentos de 90% normalmente são obtidos (GUTIERREZ *et al.*, 1991; ALVEZ, 1994).

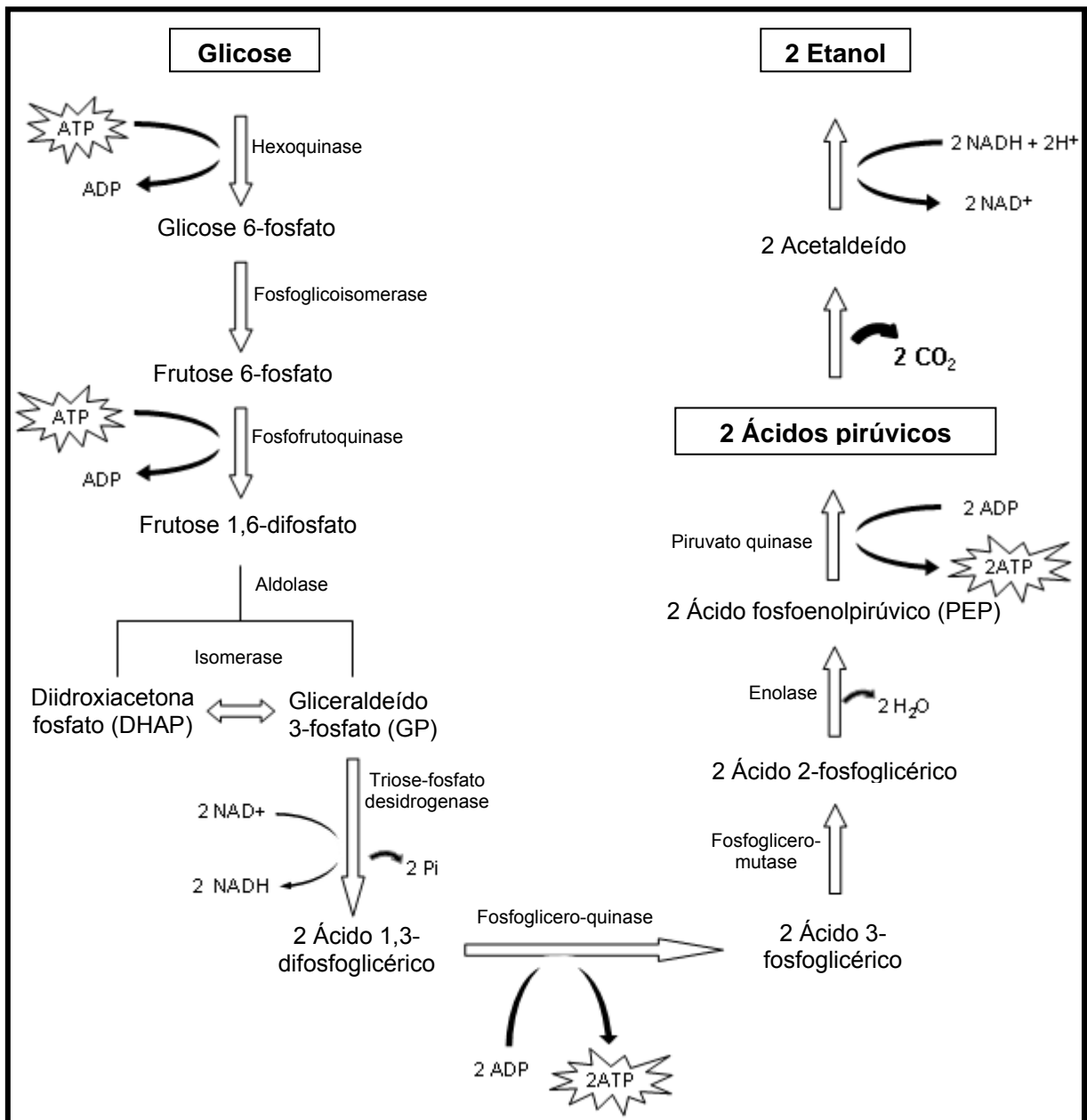


Figura 2.18. Fermentação alcoólica
Elaborado com base em TORTORA *et al.* (2005)

2.3.5. Estratégias para a produção de bioetanol de segunda geração

Com o intuito de aproveitar ambas frações polissacarídicas (celulose e hemicelulose) das biomassas residuais de composição lignocelulósica para a produção de bioetanol de segunda geração, quatro estratégias são concebidas, cada uma com diferente estágio de desenvolvimento, que serão descritas a seguir.

Hidrólise e Fermentação em Separado (*Separated Hydrolysis and Fermentation – SHF*)

É a concepção mais antiga, na qual a hidrólise da celulose, após o pré-tratamento da biomassa para a hidrólise e solubilização da hemicelulose, ocorre num estágio separado da fermentação, bem como a produção de celulases que são utilizadas na hidrólise da celulose. Neste tipo de estratégia os açúcares provenientes da hemicelulose após o pré-tratamento podem ser convertidos a etanol em um fermentador separado, sendo o sólido remanescente, denominado celulignina, encaminhado para a hidrólise da celulose (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008). O fluxograma apresentado na Figura 2.19 descreve o processo SHF.

A principal vantagem dessa estratégia é permitir que a hidrólise e a fermentação possam ser conduzidas nas condições ótimas. Geralmente, a temperatura ótima para as celulases está entre 45°C e 50°C, dependendo do microrganismo produtor. E a temperatura ótima para a maior parte dos microrganismos produtores de etanol está entre 30°C e 37°C (OLSSON *et al.*, 2006).

Por outro lado, a principal desvantagem é a inibição do complexo celulásico pelos açúcares liberados na hidrólise, principalmente celobiose e glicose que se acumulam no meio, conferindo uma hidrólise incompleta da celulose e rendimentos não muito altos (WINGREN *et al.*, 2005).

Segundo TAHERZADEH & KARIMI (2007), outra desvantagem do SHF é a possibilidade de contaminação. Como o tempo envolvido na etapa de hidrólise é muito longo, a solução de glicídios torna-se uma fonte disponível para os microrganismos indesejados. Além disso, as próprias enzimas podem constituir uma fonte potencial de contaminação. Em escala industrial, seria muito difícil esterilizar

as celulases, já que isso deveria ser feito por filtração, pois a autoclavação inativaria as enzimas.

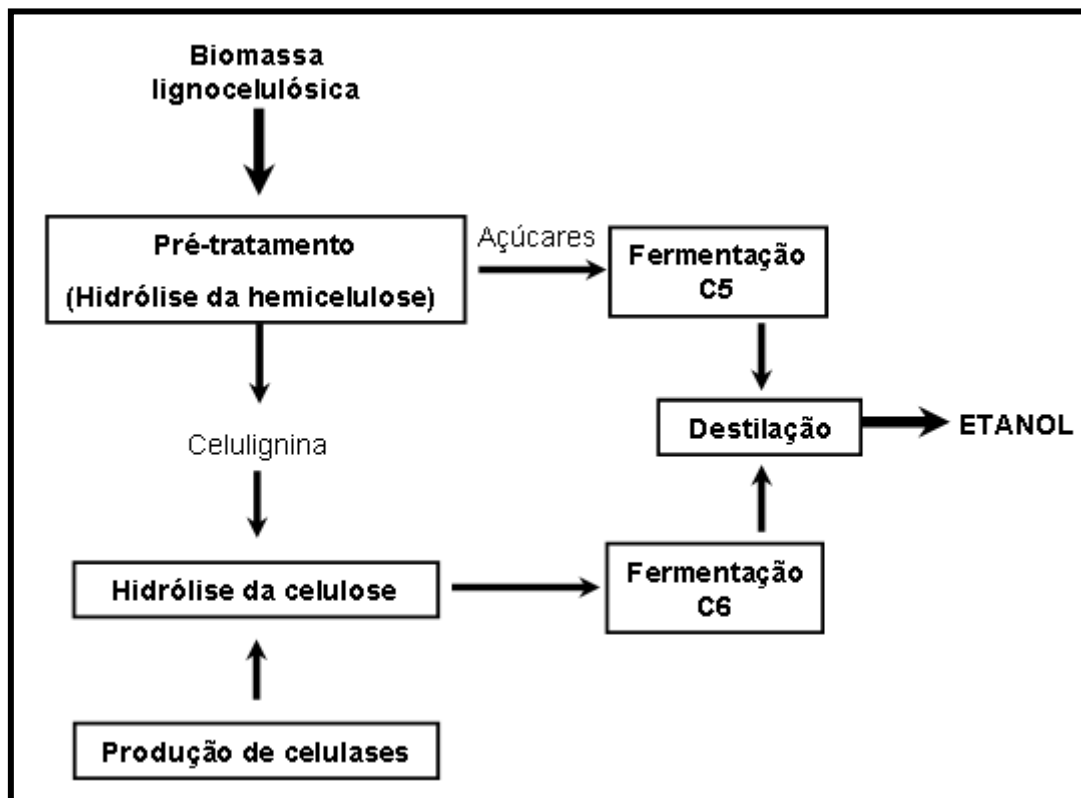


Figura 2.19. Diagrama da Sacarificação e Fermentação em Separado (SHF)
Elaborado com base em TAHERZADEH & KARIMI (2007)

Sacarificação e Fermentação Simultânea (*Simultaneous Saccharification and Fermentation – SSF*)

Como o nome indica, neste processo, a hidrólise enzimática e a fermentação das hexoses (açúcares C6) ocorrem na mesma etapa, enquanto a hidrólise da hemicelulose ocorre em etapa diferente, bem como a produção das celulases, como pode ser visualizado na Figura 2.20 (TAHERZADEH & KARIMI, 2007).

Essa estratégia de processo apresenta inúmeras vantagens, dentre elas: a redução da inibição das celulases pelos seus produtos de hidrólise, uma vez que os glicídios não se acumulam no meio; menor complexidade e custo do processo, comparado ao SHF, pois reduz o número de reatores; minimização dos riscos de contaminação, devido às baixas concentrações de açúcar livre no meio; e maiores

rendimentos de hidrólise, já que o equilíbrio das reações enzimáticas são deslocados no sentido de formação de mais produto, visto que a glicose é concomitantemente consumida (VÁSQUEZ *et al.*, 2007).

Entretanto, o desfavorecimento da cinética enzimática devido à necessidade de conduzir o processo dentro da faixa ótima do microorganismo fermentador constitui uma desvantagem. Em relação a este aspecto, estudos têm sido realizados no sentido de produzir celulases que atuem em valores de pH e temperatura próximos daqueles ótimos para o processo fermentativo (TAHERZADEH & KARIMI, 2007).

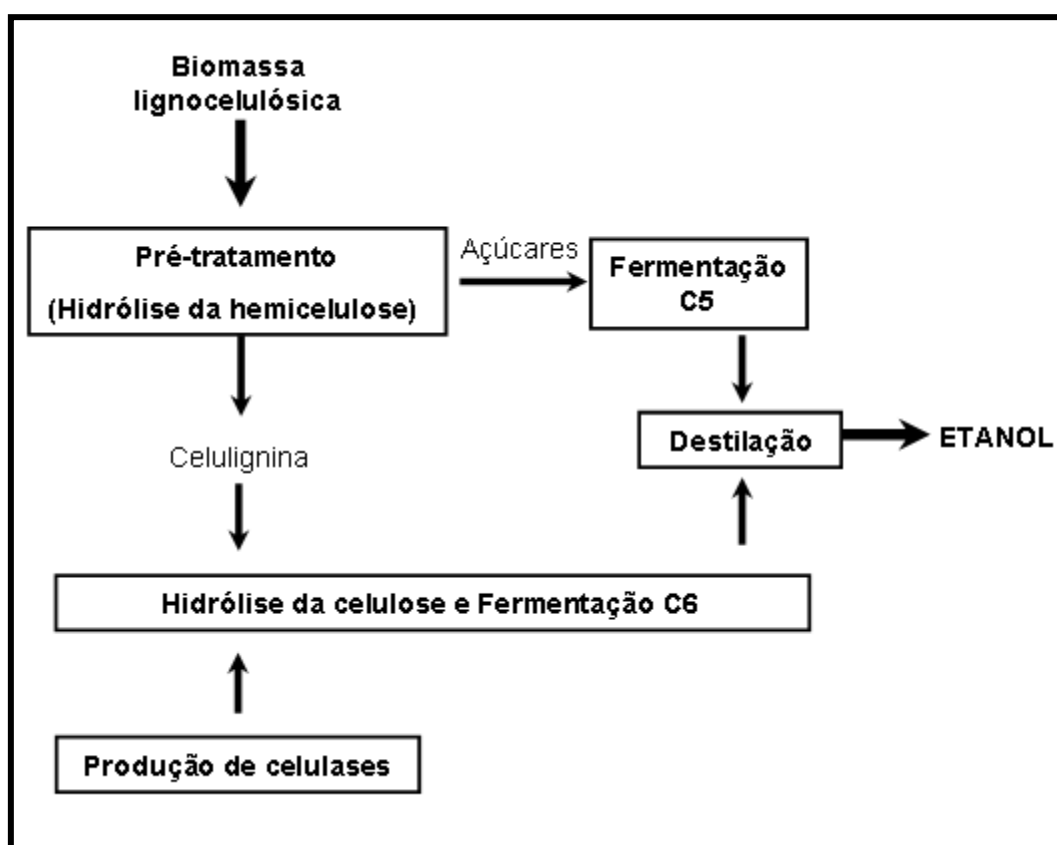


Figura 2.20. Diagrama da Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF)
Elaborado com base em TAHERZADEH & KARIMI (2007)

Sacarificação e Co-fermentação Simultânea (*Simultaneous Saccharification and Cofermentation – SSCF*)

Outro modo de operação é o SSCF, no qual a co-fermentação se refere à fermentação de ambos açúcares, pentoses e hexoses, que ocorre no mesmo reator,

juntamente com a sacarificação da celulose (Figura 2.21). A hidrólise da hemicelulose e a produção de celulases ocorrem separadamente (TEIXEIRA *et al.*, 2000).

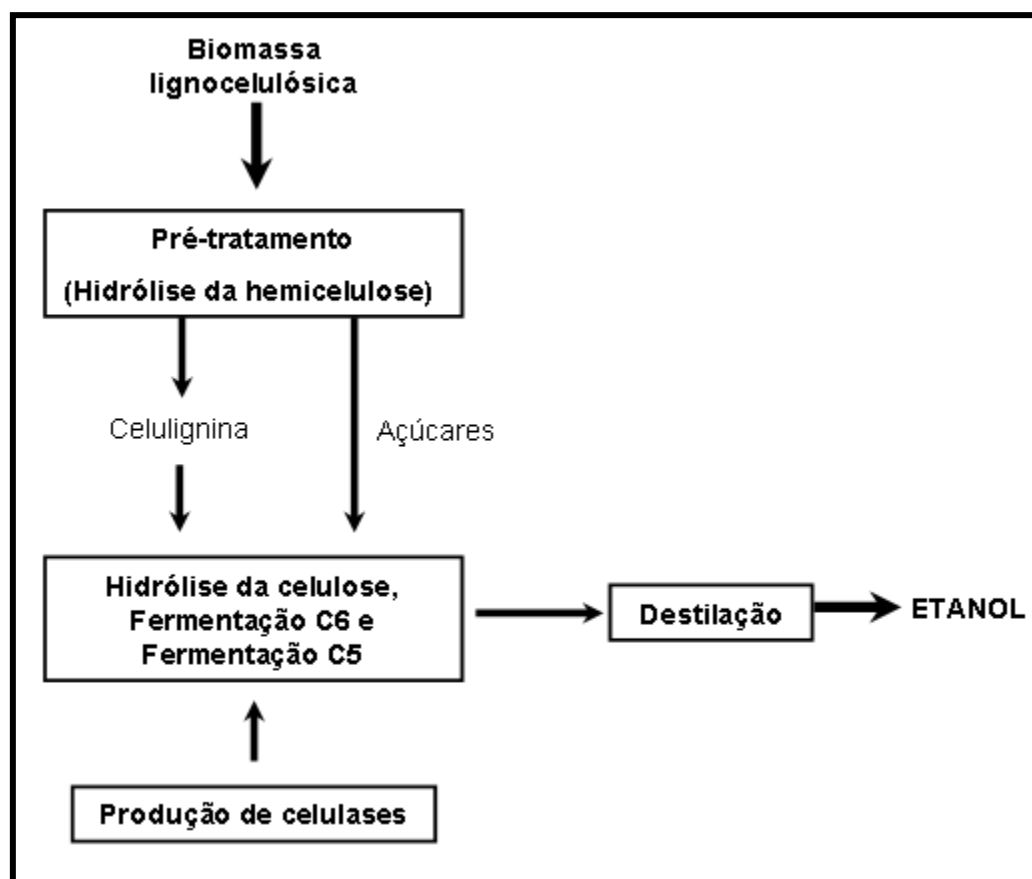


Figura 2.21. Diagrama do processo de Sacarificação e Co-Fermentação Simultânea
Elaborado com base em TAHERZADEH & KARIMI (2007)

Como vimos anteriormente, no reator do SSF, somente as hexoses são convertidas a etanol e as pentoses são fermentadas em outro reator, por um organismo diferente. Já no processo de SSCF, tanto as hexoses quanto as pentoses são fermentadas por um único microrganismo em um mesmo reator (HAMELINCK *et al.*, 2005). Para isso, é necessária a aplicação da engenharia genética para desenvolver um microrganismo que fermente ambos os açúcares. Existem vários exemplos na literatura de microrganismos modificados geneticamente para essa finalidade (LAWFORD & ROUSSEAU, 1998; Mcmillan *et al.*, 1999; TEIXEIRA *et al.*, 2000).

Bioprocesso consolidado (*Consolidated Bioprocess* – CBP)

Em todos os processos descritos anteriormente se faz necessária uma unidade separada dedicada à produção de enzimas, ou as enzimas devem ser adquiridas de um produtor externo. No CBP, tanto a produção de enzimas quanto a de etanol, produzido a partir dos açúcares da hemicelulose e celulose, são conduzidas em um único reator e realizado pelo mesmo microorganismo (Figura 2.22) (TAHERZADEH & KARIMI, 2007).

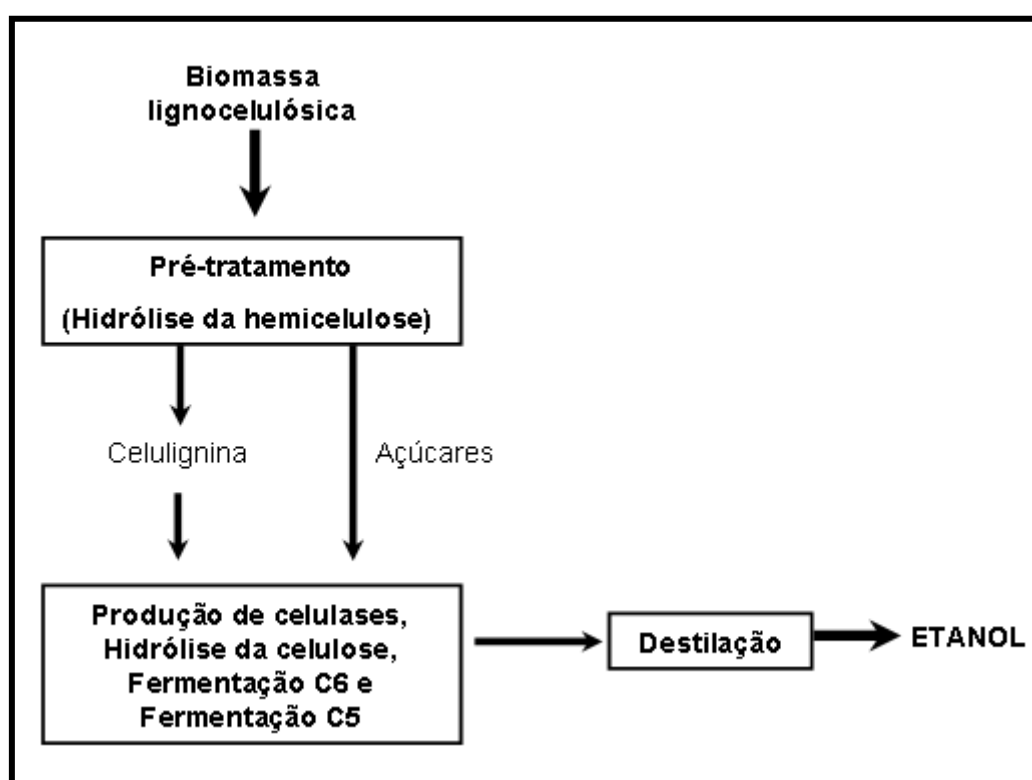


Figura 2.22. Diagrama do Bioprocesso Consolidado (CBP)
Elaborado com base em TAHERZADEH & KARIMI (2007)

Duas estratégias podem ser seguidas para a obtenção de organismos para o Bioprocesso Consolidado. A primeira estratégia envolve a modificação de microrganismos naturalmente produtores de etanol, a fim de torná-los produtores eficientes também de celulases e/ou xilanasas, se a hidrólise da hemicelulose também for enzimática. A segunda estratégia segue o caminho oposto, ou seja, modificar excelentes produtores de celulases com a finalidade de transformá-los também em eficientes produtores de etanol (LYND *et al.*, 2005).

Segundo LYND *et al.* (2002), todavia não existem organismos ou consórcios de microrganismos capazes de produzir celulases nos níveis desejados e também produzir etanol com alta produtividade e altas concentrações, embora vários organismos já combinem ambas as funções.

FUJITA *et al.* (2004) desenvolveram uma cepa de *S. cerevisiae* em cuja superfície celular foram expressos três tipos de enzimas celulolíticas, obtendo um rendimento de 0,45 g/g (gramas de etanol por grama de carboidrato consumido), o que corresponde a 88,5% do rendimento teórico. Outro trabalho similar a este foi publicado por DEN HAAN *et al.* (2007), demonstrando a possibilidade de se desenvolver cepas de leveduras capazes de crescer e de converter celulose em etanol e uma única etapa.

O CBP parece ser uma abordagem alternativa com visível potencial e o ponto final na evolução da produção de bioetanol de segunda geração, a partir de materiais lignocelulósicos. A aplicação do CBP não vincula custos de operação ou investimento de capital para a compra de enzimas ou sua produção, apresentando assim vantagens em relação ao custo de produção (LYND *et al.*, 2005).

Independentemente da rota tecnológica, é importante notar o enorme peso que o custo da biomassa tem sobre o custo final do bioetanol. Em geral, nas estimativas realizadas para os países do hemisfério norte, o custo da biomassa representa cerca de 40% do custo do bioetanol, e grande parte das reduções do custo do biocombustível para o futuro se baseia na redução do valor da biomassa. Evidentemente, isso cria grandes expectativas quando se considera algumas regiões do planeta, para as quais existem opções de biomassa com custos bem mais baixos, como por exemplo, a cana-de-açúcar no Brasil, ou de resíduos agroflorestais, como os da indústria de celulose, que tem custo de produção irrelevante (BNDES, 2008).

2.3.6. Principais resultados reportados na literatura

Na Tabela 2.7 estão resumidas algumas condições utilizadas na produção de bioetanol de segunda geração por SSF, estratégia de processo mais empregada, a partir de biomassas de composição lignocelulósica.

Tabela 2.7. Condições empregadas no SSF para produção de bioetanol de segunda geração na literatura (HE: Hidrólise Enzimática; MO: Microorganismo)

Material	Pré-tratamento	Pré-HE	Carga enzimática		Teor de sólido (%)	MO	Conc. celular (g/L)	Conc. de etanol (g/L)	Tempo (h)	Qp (g/L.h)	Referência
			Celulases (FPU/g)	β -glucosidase (UI/g)							
Lama de cal da indústria celulose	Não	Não	15,0	30,0	6	<i>S. cerevisiae</i>	0,05	45,0	150	0,30	KANG <i>et al.</i> , 2010
Cavaco de <i>Pinus</i>	H ₂ SO ₄ e NaHSO ₄	12 h	15,0	22,5	8	<i>S. cerevisiae</i>	2,0	41,8	–	–	ZHU <i>et al.</i> , 2010
Palmiste	Não	48 h	6,0	–	30	<i>S. cerevisiae</i> panificação	7,0	70,0	216	0,32	JORGENSEN <i>et al.</i> , 2010
Madeira de oliva	Explosão com vapor (SO ₂) e deslignific. peróxido alcalino	Não	15,0	12,6	10	<i>S. cerevisiae</i>	–	29,4	72	0,41	RUIZ <i>et al.</i> , 2006
Caule de girassol	Explosão com vapor (SO ₂) e deslignific. peróxido alcalino	Não	15,0	12,6	10	<i>S. cerevisiae</i>	–	20,9	72	0,29	RUIZ <i>et al.</i> , 2006
<i>Picea abies</i>	Explosão com vapor (SO ₂)	16 h	15,0	23,0	5	<i>S. cerevisiae</i> panificação	5,0	26,0	71	0,37	WINGREN <i>et al.</i> , 2005
<i>Picea abies</i>	Explosão com vapor (SO ₂)	16 h	7,5	23,0	5	<i>S. cerevisiae</i> panificação	5,0	24,0	71	0,34	WINGREN <i>et al.</i> , 2005
<i>Picea abies</i>	Explosão com vapor (SO ₂)	Não	32,0	28,0	2	<i>S. cerevisiae</i> panificação	–	7,0	96	0,07	STENBERG <i>et al.</i> , 1999

Material	Pré-tratamento	Pré-HE	Carga enzimática		Teor de sólido (%)	MO	Conc. celular (g/L)	Conc. de etanol (g/L)	Tempo (h)	Qp (g/L.h)	Referência
			Celulases (FPU/g)	β -glucosidase (UI/g)							
<i>Picea abies</i>	Explosão com vapor (SO ₂)	Não	32,0	28,0	5	<i>S. cerevisiae</i> panificação	–	19,0	96	0,20	STENBERG <i>et al.</i> , 1999
<i>Picea abies</i>	Explosão com vapor (SO ₂)	Não	32,0	28,0	7,5	<i>S. cerevisiae</i> panificação	–	25,0	96	0,26	STENBERG <i>et al.</i> , 1999
Bagaço de cana	Ácido e deslignific. com NaOH	12 h	25,9	–	10	<i>S. cerevisiae</i> panificação	4,0	30,0	22	1,36	VÁSQUEZ <i>et al.</i> , 2007
Bagaço de cana	Ácido e deslignific. com NaOH	12 h	25,0	–	23	<i>Z. mobilis</i>	4,0	60,0	36	1,66	SANTOS <i>et al.</i> , 2010
Bagaço de cana	Explosão com vapor (H ₂ SO ₄)	Não	8,3	7,8	5	<i>S. cerevisiae</i>	0,2	12	48	0,25	MARTIN <i>et al.</i> , 2002
Sabugo de milho	Ácido (H ₂ SO ₄)	48 h	8,0	–	12,5	<i>K. marxianus</i>	10,0	5,68	48	0,12	ZHANG <i>et al.</i> , 2009
Selagem de milho	Hidrotémico	24 h	30,0	–	13	<i>S. cerevisiae</i> panificação	0,2	20,0	194	0,10	XU <i>et al.</i> , 2009
Palha de milho	Explosão com vapor (SO ₂)	16 h	10,0	16,7	10	<i>S. cerevisiae</i> panificação	1,0	26,7	96	0,28	ÖHGREN <i>et al.</i> , 2007
Palha de trigo	Explosão com vapor (H ₂ SO ₄)	Não	15,0	12,6	10	<i>K. marxianus</i>	0,2	0,6	72	0,01	BALLESTEROS <i>et al.</i> , 2006
Palha de cevada	Explosão com vapor (H ₂ SO ₄)	Não	20,0	25,0	10	Levedura	5,0	25,0	120	0,21	LINDE <i>et al.</i> , 2006

CAPÍTULO 3

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Neste capítulo é apresentada a justificativa para o desenvolvimento da presente pesquisa, assim como o objetivo geral do trabalho e os objetivos específicos idealizados para que esse fosse alcançado.

3.1. JUSTIFICATIVA

Petróleo, gás natural e seus derivados representam 55% do consumo mundial de energia. São esses combustíveis que permitem a existência dos meios de transporte rápidos e eficientes que temos hoje, bem como boa parte das atividades industriais. Lamentavelmente, a previsão de durabilidade para as fontes de petróleo não ultrapassa mais do que algumas décadas: como combustíveis fósseis, as suas reservas são finitas; a segurança de abastecimento é problemática para muitos países que os importam; e o seu uso é a principal fonte dos gases que estão provocando mudanças climáticas e o aquecimento global.

É preciso, pois, encontrar substitutos para esses combustíveis. Nada mais racional do que produzi-los com base em matéria orgânica renovável (biomassa), da

qual, no passado distante, os combustíveis fósseis foram produzidos pela natureza. Uma das opções é o bioetanol, um excelente substituto para a gasolina que é o principal combustível renovável usado em automóveis no mundo.

No Brasil, o etanol, produzido da cana-de-açúcar, já substitui hoje metade da gasolina que seria consumida e seu custo é competitivo sem os subsídios que viabilizaram o programa no seu início, o Proálcool. Com a crescente demanda do mercado nacional e internacional de álcool, faz-se necessário expandir as áreas de cultivo para que a mesma seja atendida. No entanto, para evitar a expansão desmedida das áreas de cultivo, têm se desenvolvidos processos biotecnológicos que permitam a utilização dos resíduos industriais lignocelulósicos já existentes para a produção de etanol de segunda geração. Dentre estes resíduos, os resíduos celulósicos do processo de decantação da indústria de celulose constituem uma das fontes mais promissoras de carboidratos para a produção de etanol de segunda geração.

Dentro desta panorâmica, torna-se evidente a importância do desenvolvimento de processos de produção de etanol a partir do resíduo oriundo do processo de decantação da indústria de celulose. É neste contexto que esta pesquisa de dissertação se propõe a desenvolver a sacarificação e fermentação simultânea (processo SSF) para a produção de bioetanol a partir da fração celulósica do resíduo da indústria de celulose. Com isto, pretende-se ampliar a temática dos trabalhos desenvolvidos nos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO) do Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Química da UFRJ.

3.2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral a produção de bioetanol carburante empregando uma concepção de processo denominado SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) a partir da celulose contida na celulignina do resíduo celulósico do sistema de decantação da indústria de celulose, utilizando linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e visando estabelecer condições de processo que aumentem a produtividade e eficiência.

Para alcançar o objetivo descrito, alguns objetivos específicos foram definidos:

- ✓ Avaliar a fermentabilidade do resíduo fibroso (PM3) da indústria de celulose para a produção de bioetanol, comparando sua potencialidade com a da polpa coletada após o cozimento (PM1) e a polpa coletada após a etapa de deslignificação (PM2) para o mesmo propósito;
- ✓ Realizar um estudo dos efeitos da carga enzimática e da relação sólido:líquido que influenciam a concentração de glicose liberada na hidrólise enzimática da biomassa residual PM1 e das polpas PM2 e PM3;
- ✓ Determinar as melhores condições de hidrólise enzimática do resíduo PM3;
- ✓ Otimizar o processo SSF do resíduo PM3, validando-o com as condições estabelecidas;
- ✓ Comparar a performance da levedura *S. cerevisiae* de panificação com a levedura industrial *S. cerevisiae* JP1;
- ✓ Avaliar o desempenho do complexo celulásico LADEBIO produzido por uma linhagem de *Penicillium funiculosum* no processo SSF da biomassa residual PM3, comparando-o com as celulasas da Multifect;
- ✓ Avaliar a influência da suplementação do hidrolisado com fontes de nitrogênio, fosfato e sais sobre a concentração de etanol.

CAPÍTULO 4

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados para o desenvolvimento da pesquisa e as diferentes metodologias empregadas em cada experimento realizado.

4.1. MATÉRIA-PRIMA

As três biomassas utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pela empresa Aracruz Celulose e codificadas como PM1, PM2 e PM3 (Figuras 4.1 e 4.2). A biomassa PM1 consistiu da polpa coletada após o cozimento, etapa do processamento onde os cavacos são tratados com licor branco, contendo hidróxido de sódio e sulfato de sódio, a fim de remover a lignina e separar as fibras celulósicas da madeira. A biomassa PM2 consistiu da polpa coletada após a etapa de deslignificação. Nesta etapa do processamento, a polpa proveniente do cozimento era submetida a uma deslignificação com oxigênio a fim de remover o conteúdo de lignina residual da polpa que alimenta a planta de branqueamento e enviar a lignina dissolvida de volta ao sistema de recuperação. E a biomassa PM3 era o resíduo

celulósico proveniente do sistema de decantação, onde foram reunidas todas as fibras refugadas de algumas etapas do processo, ou seja, fibras que não têm qualidade requerida para constituir a pasta de celulose ou papel.

Após o recebimento dessas biomassas, o pH foi ajustado para 4,5 – 5,0 pela adição de ácido clorídrico, em virtude da natureza altamente alcalina, realizaram-se lavagem, empregando-se 35L de água para cada quilo de biomassa, e secagem, apresentando teores de umidades de 7,8% (PM1), 8,2% (PM2) e 4,5% (PM3). Em todos os experimentos considerou-se a massa seca de cada biomassa.

Todas as biomassas foram oriundas do processo de celulose que é produzida majoritariamente a partir da madeira do híbrido de *Eucalyptus grandis* com *E. urophylla*, que foi modificado geneticamente no programa de melhoramento genético clássico da empresa Aracruz Celulose.

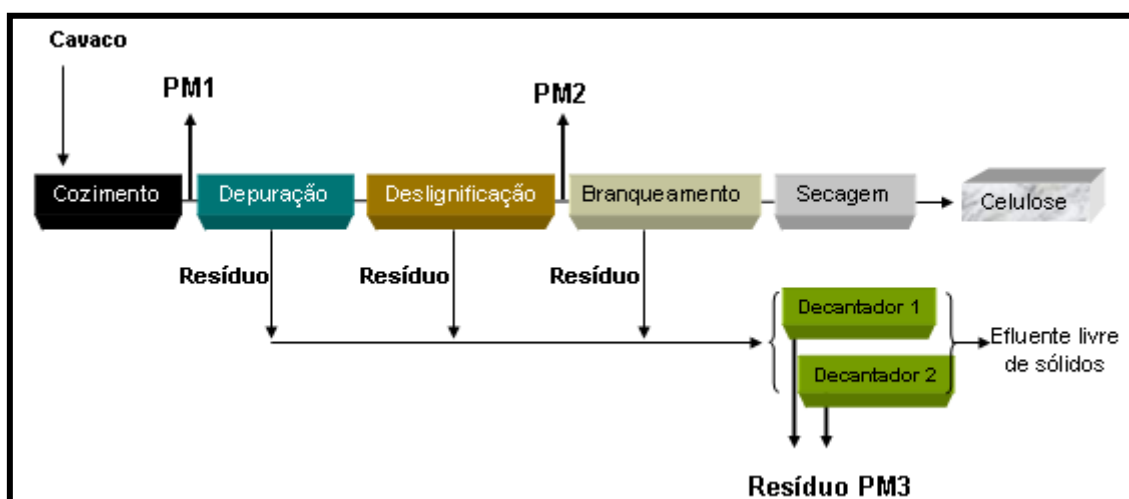


Figura 4.1. Fluxograma da produção de celulose

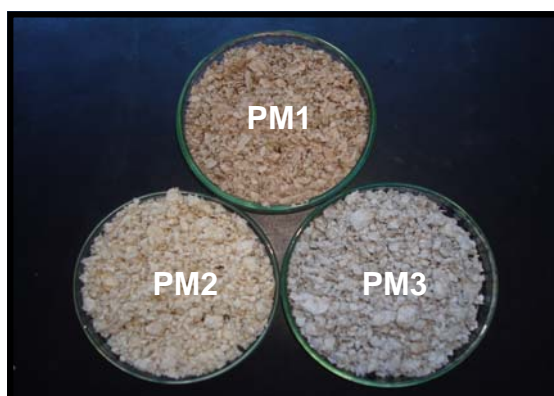


Figura 4.2. Polpas PM1 e PM2 e resíduo PM3 da indústria de celulose

4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS PM1, PM2 E PM3

A caracterização das polpas PM1 e PM2 e do resíduo PM3 foi realizada no Centro de Tecnologia da Indústria Aracruz Celulose. Na caracterização foi possível quantificar a porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina de cada biomassa.

4.3. MICROORGANISMO

Nos experimentos da avaliação da fermentabilidade das biomassas PM1, PM2 e resíduo PM3, otimização e validação do processo SSF de PM3, utilizou-se a estirpe comercial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann) empregada no processo de panificação, sendo a concentração celular baseada na massa seca.

Nos processos SSF realizados em biorreator, a fim de comparar o desempenho das celulasas LADEBIO com o das enzimas Multifect e avaliar a influência da suplementação do hidrolisado sobre a concentração de etanol, utilizou-se a linhagem industrial de *S. cerevisiae* JP1 - cedida pela Usina Japungu (Santa Rosa – PB). Esta linhagem industrial foi selecionada devido à sua robustez, resistência a altas concentrações de substrato e produto e redução do risco de contaminação. A manutenção, ativação e propagação desta linhagem de levedura são descritas a seguir.

4.3.1. Manutenção, ativação e propagação celular de *S. cerevisiae* JP1

Para manutenção, a levedura foi repicada em meio sólido (Tabela 4.1), com pH 5,0, incubada a 30°C por 24h e estocada sob refrigeração (4°C).

Tabela 4.1. Meio de cultura para manutenção da *S. cerevisiae* JP1

Componente do meio de cultura	Concentração (g/L)
Glicose	20,0
Extrato de levedura	10,0
Agar	15,0

Fonte: PEREIRA Jr. (1991)

O cultivo de ativação das células para obtenção do pré-inóculo foi realizado em frascos cônicos de 500 mL, com 200 mL de meio líquido (Tabelas 4.2 e 4.3) com pH 5,0, contendo 3 colônias da levedura, mantidos a uma temperatura de 37°C e sob agitação de 200 rpm. O tempo do cultivo de ativação foi determinado baseado na duração da fase log ou crescimento exponencial apresentada na cinética realizada.

Tabela 4.2. Meio de cultura para crescimento do pré-inóculo

Componente do meio de cultura	Concentração
Glicose	20,0 g/L
Extrato de levedura	10,0 g/L
Uréia	1,25 g/L
KH ₂ PO ₄	1,1 g/L
Solução de sais e ácido cítrico	40,0 mL/L

Fonte: DANESI *et al.* (2006)

Tabela 4.3. Composição da solução de sais minerais e ácido cítrico

Componente	Concentração (g/L)
MgSO ₄ .7H ₂ O	12,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,90
MnSO ₄	0,19
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,30
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,035
H ₃ BO ₃	0,050
KI	0,009
Al ₂ (SO ₄) ₃	0,0125
Ácido Cítrico	12,5

Fonte: DU PEREZ *et al.* (1985)

A propagação do inóculo foi conduzida em biorreator instrumentado (New Brunswick BioFlo 310®) (Figura 4.3), contendo 1,2 L do meio de cultura utilizado

para a propagação do pré-inóculo (Tabela 4.2 e 4.3) adicionado de 10% do volume do pré-inóculo crescido pelo tempo determinado a partir da cinética realizada. O processo foi controlado automaticamente a uma temperatura de 37°C, uma relação de aeração de 0,4 - 3,3 vvm e pH 4,5 mediante adição de NaOH (2M) ou HCL (2M). Para o crescimento do inóculo, realizou-se batelada alimentada com pulsos, na qual a alimentação constituía-se de solução de glicose concentrada (800 g/L), cujo volume adicionado foi calculado a fim de manter a concentração de glicose do meio em torno de 20,0 g/L.

A fim de se obter a concentração de inóculo desejada, determinou-se o volume apropriado de meio de propagação que foi centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos. Em seguida as células foram resuspensas assepticamente no meio de fermentação.

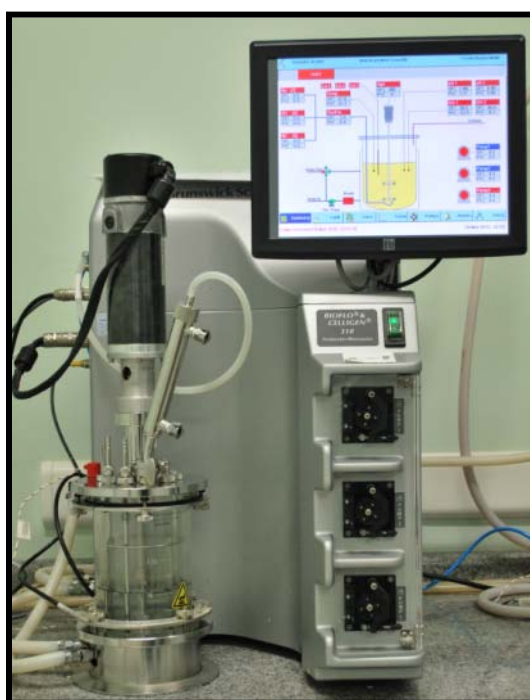


Figura 4.3. Biorreator instrumentado

4.4. AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DE PM1, PM2 E PM3 PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Com o propósito de avaliar o potencial das polpas PM1 e PM2 e do resíduo PM3, dois processos SSF para a produção de etanol foram realizados com cada

biomassa. Os processos foram conduzidos em fermentômetros de 500 mL, contendo 200 mL de hidrolisado, utilizando uma relação sólido:líquido (S:L) 1:4 – para cada grama de sólido, adicionou-se 4 mL de meio reacional (tampão citrato de sódio e ácido cítrico + enzima) – e concentração celular de 2 g/L. Cada processo foi mantido a uma temperatura de 37°C e sob agitação de 200 rpm.

Antes do processo SSF, realizou-se uma pré-hidrólise enzimática com 12 h de duração, em 47°C, utilizando celulases comerciais Multifect (Genencor) com carga enzimática de 32 FPU/g de sólido e meio tamponado com citrato de sódio e ácido cítrico (pH 5,0). O complexo celulásico apresentava 100 FPU/mL de atividade FPásica, 125 U/mL de atividade β -glucosidásica e 5.500 U/ml de atividade CMCásica que foram determinadas pelo método GHOSE (1987).

Uma amostra de cada experimento foi coletada após a pré-hidrólise enzimática, para quantificação de açúcares. A concentração de etanol equivalente foi utilizada para construir os perfis cinéticos do SSF. E no final desse processo, uma amostra de cada experimento foi coletada para quantificação de açúcares e etanol.

4.5. ESTUDO COMPARATIVO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PM1, PM2 E PM3

Para o estudo comparativo da hidrólise enzimática das biomassas PM1, PM2 e PM3, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com cada biomassa, considerando 2 variáveis independentes em 2 níveis e com 3 repetições do ponto central, cujas condições foram variadas nas faixas especificadas na Tabela 4.4. A variável de resposta escolhida foi a concentração de glicose.

Tabela 4.4. Intervalo utilizado para construir o DCCR para a hidrólise enzimática de PM1, PM2 e PM3

Fatores	- α	-1	0	+1	+ α
Relação sólido:líquido (g:mL)	1:11	1:10	1:7,5	1:5	1:4
Carga enzimática (FPU/g)	7	10	17,5	25	28

A hidrólise enzimática foi realizada em frascos cônicos, contendo 200 mL de meio reacional mais biomassa, agitados a 200 rpm, utilizando celulases comerciais

Multifect, meio tamponado com citrato de sódio e ácido cítrico (pH 5,0) e a uma temperatura de 47°C. Para a construção dos perfis cinéticos da hidrólise enzimática, foram coletadas amostras em intervalos de tempo apropriado.

4.6. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO SSF DE PM3

A fim de otimizar o processo SSF e determinar as melhores condições, realizou-se planejamentos seqüenciais constituídos de um Delineamento Composto Central Rotacional e de um planejamento univariável.

4.6.1. Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)

No DCCR, avaliou-se 2 variáveis independentes em 2 níveis e duplicatas do ponto central, cujas condições foram variadas nas faixas especificadas na Tabela 4.5. A concentração final de etanol foi selecionada como variável de resposta.

Tabela 4.5. Intervalo utilizado para construir o DCCR para o processo SSF de PM3

Fatores	- α	-1	0	+1	+ α
Concentração de inóculo (g/L)	0,4	1	2,5	4	4,6
Tempo de pré-hidrólise enzimática (h)	11,8	13	16	19	20,2

O processo SSF foi realizado em fermentômetros contendo 200 mL de hidrolisado, a uma temperatura de 47°C e sob agitação de 200 rpm. As condições da pré-hidrólise enzimática utilizadas foram determinadas a partir do planejamento de hidrólise realizado. Ao final da pré-hidrólise enzimática, uma amostra de cada experimento foi coletada para quantificação de açúcares disponíveis para a levedura no início do SSF. A concentração de etanol equivalente foi utilizada para construir os perfis cinéticos do SSF. E no final desse processo, uma amostra de cada experimento foi coletada para quantificação de açúcares e etanol.

4.6.2. Planejamento univariável

No planejamento univariável avaliou-se o efeito da variável independente concentração celular em 5 níveis: 2,0 g/L; 4,0 g/L; 6,0 g/L; 8,0 g/L; e 10,0 g/L. Cada experimento foi realizado em duplicata. A concentração final de etanol foi selecionada como variável de resposta. O processo SSF foi realizado nas mesmas condições do DCCR para o processo SSF, mudando apenas a concentração celular e utilizando o tempo de pré-hidrólise enzimática de acordo com o DCCR.

Ao final da pré-hidrólise enzimática, uma amostra de cada experimento foi coletada para quantificação de açúcares. A concentração de etanol equivalente foi utilizada para construir os perfis cinéticos do SSF. E no final desse processo, uma amostra de cada experimento foi coletada para quantificação de açúcares e etanol.

4.6.3. Validação das melhores condições do processo SSF

A partir dos planejamentos seqüenciais realizados, determinaram-se as melhores condições – relação S:L, carga enzimática, tempo de pré-hidrólise enzimática e concentração celular – visando maximizar a concentração final de etanol. Desta maneira, realizaram-se 4 processos SSF utilizando as melhores condições do processo. A validação foi realizada em frascos agitados, contendo 200 mL de hidrolisado, utilizando celulasas Multifect, *S. cerevisiae* de panificação, temperaturas de 47°C na pré-hidrólise e 37°C a partir do início da fermentação e sob agitação de 200 rpm.

Ao final da pré-hidrólise enzimática, foram coletadas amostras para quantificação de açúcares e os perfis cinéticos do SSF foram construídos com as concentrações de etanol equivalente. No final do processo (36 h), foram coletadas amostras de cada experimento para quantificação de açúcares e etanol.

4.7. DESEMPENHO DAS CELULASES LADEBIO NO PROCESSO SSF DE PM3

Ao determinar as melhores condições da pré-hidrólise enzimática (relação S:L e carga enzimática) e do SSF (tempo de pré-hidrólise enzimática e concentração celular), realizou-se um processo utilizando o complexo celulásico LADEBIO e outro

empregando celulases comerciais Multifect. Os dois processos SSF foram conduzidos em biorreator instrumentado (New Brunswick BioFlo 310®) contendo 800 mL de hidrolisado e controlado automaticamente a uma temperatura de 37°C, 200 rpm de agitação e pH 4,5, mediante adição de NaOH (2M) ou HCL (2M).

A pré-hidrólise enzimática foi realizada em frascos cônicos agitados, cujo tempo de duração quando se utilizou enzimas LADEBIO foi modificado para 18 h, devido as características da hidrólise enzimática. A linhagem industrial *S. cerevisiae* JP1, que foi propagada através da metodologia descrita no item 4.3.1, foi utilizada em ambos os processos.

O complexo celulásico LABEBIO foi produzido pela linhagem *Penicillium funiculosum* ATCC11797 nos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos da Escola de Química da UFRJ. Em relação às atividades, essas enzimas apresentaram 12000 U/L de FPásica, 277186 U/L de CMCásica e 81650 U/L de β -glucosidásica.

No início dos processos, coletou-se uma amostra de cada experimento para quantificação de açúcares disponíveis no início da fermentação. E durante a fermentação, amostras foram coletadas em intervalos regulares para construir os perfis cinéticos do SSF.

Esses dois processos foram realizados com o objetivo de comparar o desempenho das celulases LADEBIO com o das enzimas Multifect no processo SSF de PM3 e definir com quais celulases a pesquisa daria continuidade.

4.8. SUPLEMENTAÇÃO DO HIDROLISADO

A literatura sinaliza a importância de suplementar o meio de fermentação alcoólica com fontes de nitrogênio, fosfato e sais minerais com a finalidade de melhorar o desempenho da levedura e aumentar sua produtividade volumétrica (SREEKUMAR *et al.*, 1999; DANESI *et al.*, 2006). Com base nessas afirmações, o hidrolisado de PM3 para fermentação foi suplementado com fosfato de potássio, uréia, extrato de levedura e soluções de sais minerais e ácido cítrico em concentrações equivalentes aquelas do meio de cultura utilizado para o crescimento do pré-inóculo e inóculo, apresentado na Tabela 4.2 e 4.3.

O processo SSF foi conduzido em biorreator (New Brunswick BioFlo 310®), contendo 800 mL de hidrolisado suplementado uma vez no início do processo, empregando inóculo de *S. cerevisiae* JP1, controlado automaticamente a uma temperatura de 37°C, 200 rpm de agitação e pH 4,5, mediante adição de NaOH (2M) ou HCL (2M).

A pré-hidrólise enzimática foi realizada em frascos agitados, utilizando celulases Multifect. Todos os hidrolisados foram reunidos, homogeneizados e divididos para o reator cujo hidrolisado foi suplementado e para o reator com hidrolisado que não foi suplementado. Isso foi realizado para que cada processo começasse com a mesma concentração de açúcares e o estudo sobre a importância da suplementação não fosse comprometido. Vale ressaltar que o processo com hidrolisado não suplementado realizado foi descrito no item 4.7, pois o mesmo também serviu para comparar o desempenho das celulases LADEBIO com o das Multifect.

Ao final da pré-hidrólise enzimática, uma amostra foi coletada para quantificação de açúcares. E ao longo do processo, amostras foram coletadas em intervalos regulares para construir o perfil cinético do SSF.

4.9. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.9.1. Determinação de açúcares e etanol

Os perfis cinéticos dos processos SSF realizados em frascos agitados foram construídos a partir da concentração de etanol equivalente, determinada pelo acompanhamento da perda de massa do sistema de fermentação (fermentômetro) (Figura 4.4) registrada em intervalos de tempo regulares. O fermentômetro é composto de frasco cônico acoplado a um dispositivo que permite o desprendimento de CO₂ e que impede a entrada de ar no sistema. Desta maneira, a concentração de etanol equivalente foi calculada por meio de conversão estequiométrica, ou seja, sabendo-se que a partir de uma molécula de glicose foram produzidas duas moléculas de CO₂ e duas de etanol, determinou-se a concentração de etanol equivalente a partir do CO₂ desprendido.



Figura 4.4. Fermentômetro

Após a coleta das amostras de todos os experimentos, que foram centrifugadas a 9000 rpm por 15 minutos, seus sobrenadantes foram diluídos e submetidos à quantificação de açúcares e/ou etanol.

A quantificação de açúcares redutores totais (ART) foi determinada colimetricamente, em triplicata, pelo método DNS (Ácido 3,5 Dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

A determinação da concentração de glicose, xilose, celobiose e etanol foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com o auxílio de uma coluna HPX-87P (BioRad®) utilizando água como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/minuto e uma temperatura de separação de 80°C.

4.10.2. Quantificação celular

As amostras coletadas durante a cinética de propagação do pré-inóculo e inóculo de *S. cerevisiae* JP1 foram diluídas e submetidas a leituras de absorvância realizadas em espectrofotômetro (SpectrumLab 22pc) em um comprimento de onda de 600 nm. A concentração celular foi determinada pela curva de regressão entre

as medidas de absorvância e massa seca de biomassa. A correlação foi obtida a partir da regressão linear dos pontos, como pode ser visualizada na Figura 4.5.

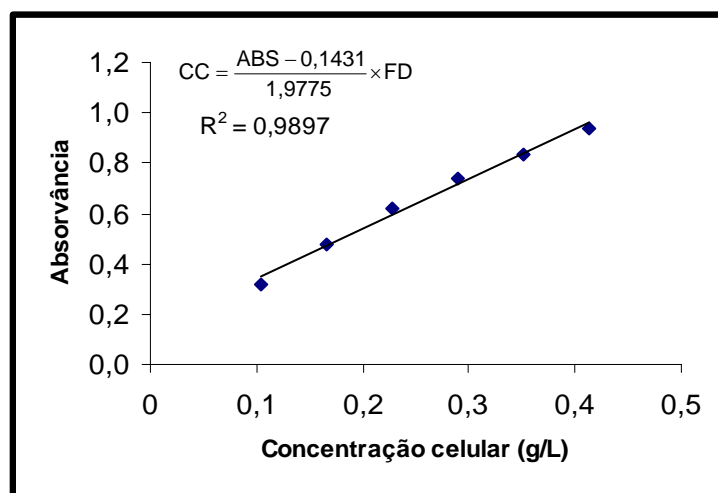


Figura 4.5. Regressão linear e coeficiente de correlação para a quantificação de biomassa de *S. cerevisiae* JP1
CC – concentração celular (g/L); ABS – absorvância; FD – fator de diluição

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados e as respectivas discussões obtidos nas seguintes etapas do trabalho: caracterização das biomassas PM1, PM2 e PM3; avaliação da fermentabilidade de PM1, PM2 e PM3; estudo comparativo da hidrólise enzimática de PM1, PM2 e PM3; otimização do processo SSF de PM3; e processos SSF de PM3 conduzidos em biorreator.

5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS PM1, PM2 E PM3

Na Tabela 5.1 estão apresentados os resultados da caracterização da polpa coletada após o cozimento (PM1), da polpa coletada após a deslignificação (PM2) e do resíduo celulósico do sistema de decantação da indústria de celulose (PM3). Verifica-se que os balanços de massas não totalizam 100%, ficando em 95,7% para PM1, 96,3% para PM2 e 98,8% para PM3. Dados citados na literatura também mostram fato semelhante para o bagaço de cana-de-açúcar (91%), palha de trigo (95%), sabugo de milho (95%) e grama (88,4%) (PANDEY *et al.*, 2000; SUN & CHENG, 2002). Possivelmente, o não fechamento do balanço em 100% deve-se aos

domínios pécticos e protéicos existentes na parede celular e às resinas extrativas e compostos inorgânicos, os quais não foram quantificados (McCANN & ROBERTS, 1991; CARPITA & GILBEAULT, 1993).

É importante verificar que o teor de celulose da polpa PM1 é um pouco menor que o da PM2, enquanto o teor de lignina de PM1 é maior (150%) do que o da PM2. Isso é explicável pelo fato da polpa PM2 ter passado pela etapa da deslignificação, a qual visa reduzir ainda mais o conteúdo de lignina e, conseqüentemente, o teor relativo de celulose aumenta, mas não na mesma proporção. Em relação ao resíduo PM3, verifica-se que os teores de celulose e hemicelulose são discretamente maiores do que aqueles de PM1 e PM2. Lembrando que o resíduo PM3 constitui-se de fibras celulósicas que foram refugadas de diferentes etapas do processo.

Tabela 5.1. Caracterização das biomassas PM1, PM2 e PM3

Componente da biomassa	PM1	PM2	PM3
Celulose (%)	77,4	79,4	80,9
Hemicelulose (%)	15,6	15,1	16,2
Lignina (%)	2,7	1,8	1,7

5.2. AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DE PM1, PM2 E PM3 PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Na Figura 5.1 podem ser visualizadas as concentrações de glicose, celobiose e xilose, quantificadas após 12 h de pré-hidrólise enzimática das polpas PM1 e PM2 e do resíduo PM3 antes do processo SSF ser realizado a fim de avaliar o potencial dessas biomassas para a produção de bioetanol.

Verificou-se que com todas as biomassas lograram-se altas concentrações de glicose após a etapa de pré-hidrólise enzimática. As biomassas PM1 e PM2 conferiram concentrações de glicose muito similares, embora PM2 tenha uma porcentagem de celulose um pouco maior e menos lignina, características conferidas pelo processo de deslignificação, o qual deveria tornar as moléculas de celulose um pouco mais suscetíveis ao ataque enzimático. Enquanto PM3 forneceu apenas 19% a menos de glicose em relação a PM1 e 17% em relação a PM2.

Embora este resíduo não apresente as características requeridas para constituir a pasta de celulose, apresenta grande potencial como fonte de açúcares fermentáveis.

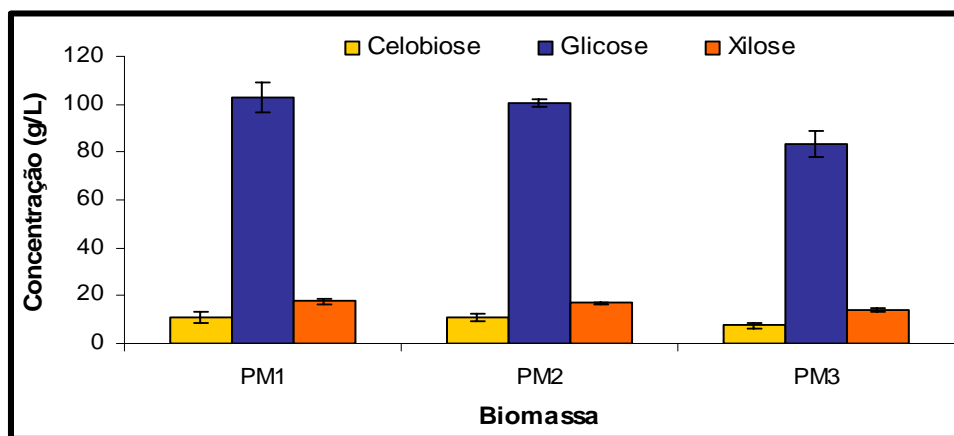


Figura 5.1. Concentração de açúcares após 12 h de pré-hidrólise enzimática, utilizando relação S:L 1:4 e 32 FPU/g de carga enzimática

Na Figura 5.2 encontram-se os perfis cinéticos dos processos SSF construídos com base na concentração de etanol equivalente. Após 96 h de processo foram obtidas concentrações médias de etanol, medidas por CLAE, de 70,3 g/L com PM1, 78,8 g/L com PM2 e 71,1 g/L com PM3 (Figura 5.3). Embora PM3 tenha conferido menor concentração de glicose do que as outras biomassas, como discutido anteriormente, a fermentação de seu hidrolisado resultou numa concentração de etanol similar a de PM1 e apenas 10% menor do que a de PM2, denotando o seu potencial para a produção deste biocombustível. Considerando que, em cada processo, a produção de etanol tenha praticamente estabilizado em torno de 65 h, os valores de produtividade volumétrica atingidos com PM1, PM2 e PM3, foi de 1,1 g/L.h, 1,23 g/L.h e 1,1 g/L.h, respectivamente.

Na Tabela 5.2 estão sumarizadas as concentrações de açúcares e etanol atingidas no final da pré-hidrólise enzimática ou início do processo SSF e no final deste processo. A partir desta tabela, verifica-se que as concentrações de xilose permaneceram praticamente constantes, indicando que a estirpe comercial de *S. cerevisiae* não é capaz de fermentar este açúcar, como amplamente reportado na literatura; que as concentrações de glicose foram muito reduzidas ao final do SSF, denotando que este açúcar foi facilmente fermentado por esta levedura; e que a

enzima β -glucosidase apresentou boa atividade, uma vez que as concentrações de celobiose encontraram-se próximas de zero ao final do SSF.

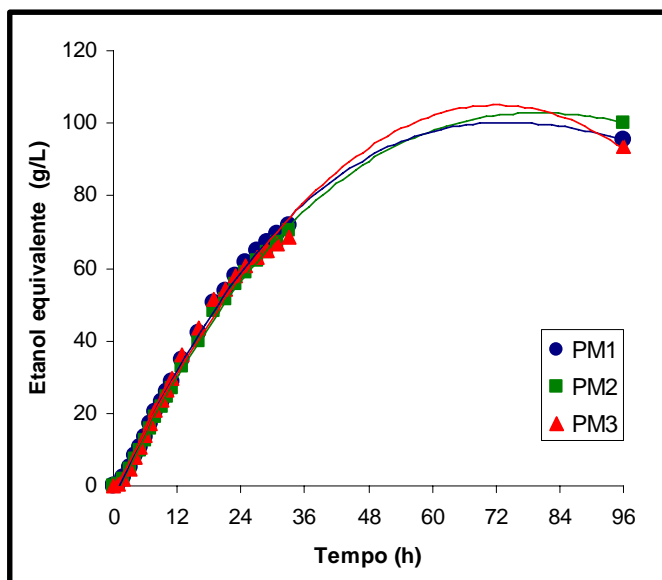


Figura 5.2. Perfis cinéticos do processo SSF das biomassas PM1, PM2 e PM3, empregando 2 g/L de *S.vervisiae* de panificação

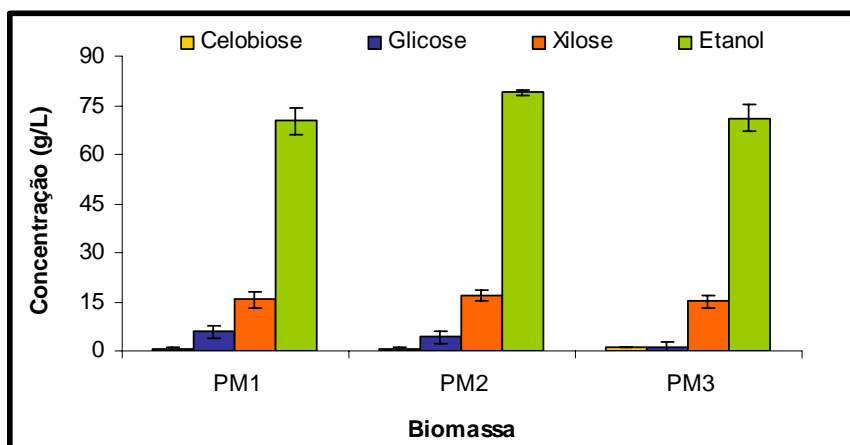


Figura 5.3. Concentração de açúcares e etanol após 96 h de SSF

Tabela 5.2. Concentrações de açúcares e etanol no início e final do SSF (96 h)

Biomassa	Início SSF			Final SSF			
	Concentração (g/L)			Concentração (g/L)			
	Celobiose	Glicose	Xilose	Celobiose	Glicose	Xilose	Etanol
PM1	11,1	102,7	17,7	0,4	5,8	15,6	70,3
PM2	11,1	100,5	16,8	0,6	4,1	17,0	78,8
PM3	7,5	83,4	14,2	1,2	1,6	15,1	71,1

Observa-se que, tanto as polpas PM1 e PM2 quanto o resíduo PM3 apresentaram-se como excelentes matérias-primas para a produção de bioetanol combustível. No entanto, PM3 possuiu fibras celulósicas que não tiveram qualidade para se constituir em polpas celulósicas, diferentemente de PM1 e PM2 que são utilizadas no processo de polpação (ARACRUZ, 2009). Contudo, as três biomassas foram mais detalhadamente investigadas na próxima série de experimentos.

5.3. ESTUDO COMPARATIVO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PM1, PM2 E PM3

Nesta etapa do trabalho objetivou-se realizar um estudo sobre a hidrólise enzimática de PM3, bem como comparar seu potencial como fonte de glicose com o das polpas PM1 e PM2. Para isso, realizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional para cada biomassa avaliando os efeitos da relação sólido:líquido (S:L) e da carga enzimática sobre a concentração de glicose, selecionada com variável de resposta.

As Figuras 5.4, 5.5 e 5.6 mostram os perfis cinéticos da hidrólise enzimática de PM1, PM2 e PM3, respectivamente.

As concentrações de açúcares obtidas ao final do tratamento enzimático de PM1, PM2 e PM3 podem ser visualizadas na Tabela 5.3, 5.4 e 5.5, respectivamente, cujos resultados mostraram que as maiores concentrações de glicose foram obtidas nos experimentos com as maiores relações S:L (experimentos 1 - 1:5 e 2 - 1:4), ou seja, com maiores teores de sólido.

Em relação às eficiências de hidrólise, para a polpa PM1, com o experimento 1 (S:L 1:5 e 25 FPU/g) obteve-se a maior concentração de glicose (95,9 g/L), correspondendo a uma conversão de 65,8% (calculada a partir da concentração inicial de celulose), enquanto no experimento 9 (S:L 1:7,5 e 28 FPU/g) atingiu-se a maior conversão (71,8%), porém com concentração de glicose 15% menor (81,6 g/L) quando comparada àquela obtida no experimento 1. Para a polpa PM2, no experimento 11 (S:L 1:4 e 17,5 FPU/g), alcançou-se a maior concentração de glicose (95,6 g/L), resultando em uma conversão de 53,1%; no entanto a maior conversão (70,2%) com esta biomassa foi obtida no experimento 3 (S:L 1:10 e 25 FPU/g), resultando em somente 56,8 g/L de glicose.

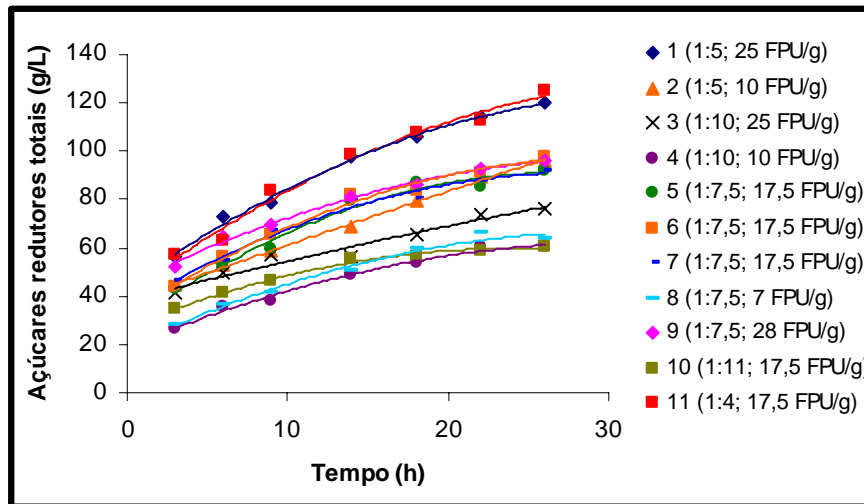


Figura 5.4. Hidrólise enzimática da biomassa PM1 conduzida a 47°C, 200 rpm e pH5

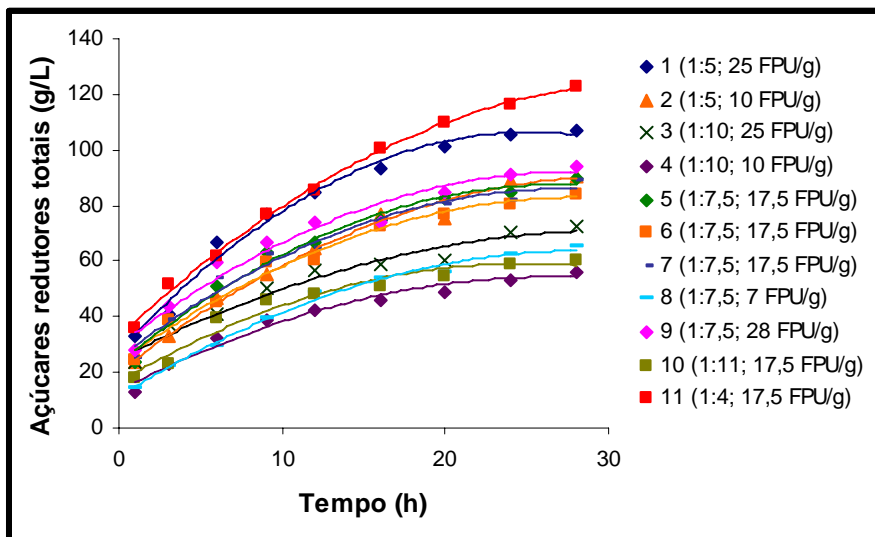


Figura 5.5. Hidrólise enzimática da biomassa PM2 conduzida a 47°C, 200 rpm e pH5

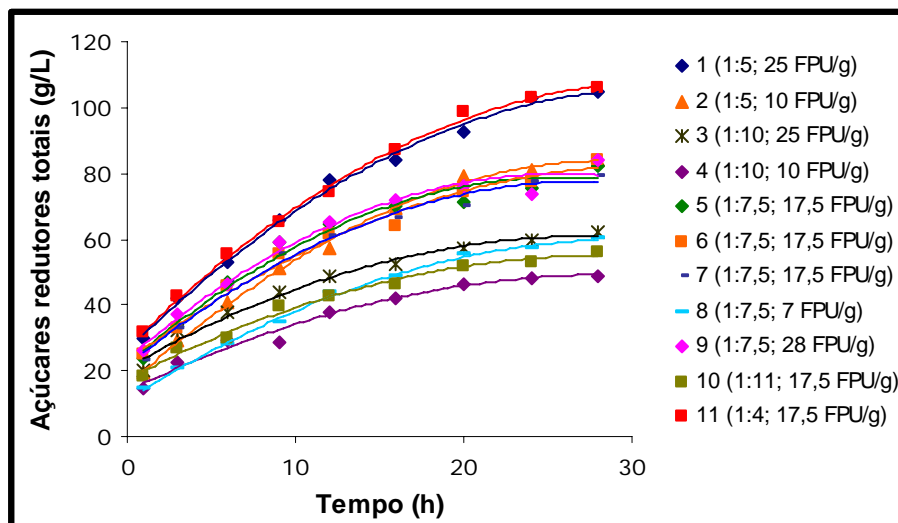


Figura 5.6. Hidrólise enzimática da biomassa PM3 conduzida a 47°C, 200 rpm e pH5

Tabela 5.3. Concentração de açúcares liberados na hidrólise enzimática (HE) de PM1

Experimento	ART (g/L)	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)	Xilose (g/L)	Eficiência HE (%)
1- 1:5; 25 FPU	119,8	95,9	5,3	18,7	65,8
2- 1:5; 10 FPU	95,7	76,7	5,8	13,5	52,6
3- 1:10; 25 FPU	76,0	43,3	1,2	6,0	54,8
4- 1:10; 10 FPU	60,7	42,2	1,2	5,9	53,4
5(C)- 1:7,5; 17,5 FPU	91,8	71,1	4,4	12,8	62,5
6(C)- 1:7,5; 17,5 FPU	97,9	73,5	4,7	13,0	64,7
7(C)- 1:7,5; 17,5 FPU	91,9	71,1	4,2	12,6	62,6
8- 1:7,5; 7 FPU	63,0	49,8	2,1	8,8	43,8
9- 1:7,5; 28 FPU	96,1	81,6	2,4	15,1	71,8
10- 1:11;17,5 FPU	60,3	49,4	5,4	8,0	68,3
11- 1:4; 17,5 FPU	125,1	88,3	3,6	17,3	50,3

(C) – ponto central

Tabela 5.4. Concentração de açúcares liberados na hidrólise enzimática (HE) de PM2

Experimento	ART (g/L)	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)	Xilose (g/L)	Eficiência HE (%)
1- 1:5; 25 FPU	108,1	86,9	5,1	14,5	58,1
2- 1:5; 10 FPU	90,2	66,1	5,7	10,4	44,2
3- 1:10; 25 FPU	72,3	56,8	3,5	8,3	70,2
4- 1:10; 10 FPU	56,0	42,1	1,7	4,3	52,0
5(C)- 1:7,5; 17,5 FPU	89,2	64,7	4,6	9,9	55,5
6(C)- 1:7,5; 17,5 FPU	84,3	64,0	4,6	9,7	54,9
7(C)- 1:7,5; 17,5 FPU	88,9	69,0	4,5	10,7	59,2
8- 1:7,5; 7 FPU	65,1	51,2	3,4	6,7	43,9
9- 1:7,5; 28 FPU	94,2	65,0	3,9	10,3	55,7
10- 1:11;17,5 FPU	60,4	43,6	1,6	5,8	58,8
11- 1:4; 17,5 FPU	121,9	95,6	6,3	16,4	53,1

(C) – ponto central

Tabela 5.5. Concentração de açúcares liberados na hidrólise enzimática (HE) de PM3

Experimento	ART (g/L)	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)	Xilose (g/L)	Eficiência HE (%)
1- 1:5; 25 FPU	104,3	80,6	2,8	13,3	53,5
2- 1:5; 10 FPU	84,0	62,6	2,9	9,7	41,5
3- 1:10; 25 FPU	62,2	43,4	0,0	6,2	53,2
4- 1:10; 10 FPU	49,1	39,6	0,0	5,2	48,5
5(C)- 1:7,5; 17,5 FPU	82,5	53,2	1,5	8,1	45,2
6(C)- 1:7,5; 17,5 FPU	84,0	62,4	2,6	9,6	53,1
7(C)- 1:7,5; 17,5 FPU	79,5	56,4	2,6	8,8	48,0
8- 1:7,5; 7 FPU	60,4	43,0	1,3	5,5	36,6
9- 1:7,5; 28 FPU	83,9	61,5	0,0	9,5	52,3
10- 1:11;17,5 FPU	56,0	42,6	1,9	6,0	56,9
11- 1:4; 17,5 FPU	105,3	76,9	3,0	12,7	42,3

(C) – ponto central

Já para o resíduo PM3, a maior concentração de glicose foi de 80,6 g/L (experimento 1), correspondendo a 53,5% de eficiência de hidrólise. A maior conversão obtida com esta biomassa residual foi 56,9%, obtida com o experimento 10, o qual resultou em apenas 42,6 g/L de glicose.

De uma maneira geral, verifica-se que para todas as biomassas, um aumento no teor de sólido diminui a conversão de celulose à glicose, corroborando os dados relatados na literatura (SEWALT *et al.*, 1997; VLASENKO *et al.*, 1997; FERRER *et al.*, 2002; LU *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2002; MENEZES & AGUIAR, 2002; VARGA *et al.*, 2002, PAN *et al.*, 2005; BERLIN *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2010). Estes resultados mostraram que um compromisso deve existir entre as variáveis de respostas do processo hidrolítico (concentração de glicose e eficiência de hidrólise). Ambas, no entanto, podem ser aumentada à medida que se associe outro processo de transformação, já que é fato conhecido que as enzimas do complexo celulásico sofrem inibição pelos seus produtos finais de hidrólise. Por outro lado, as menores eficiências de hidrólise enzimática obtidas em sistemas reacionais mais impactados em sólidos (altas relações S:L) estão relacionadas aos problemas de transferência de massa que dificultam a ação catalítica das enzimas.

Na análise estatística dos resultados dos Delineamentos Composto Central Rotacional para a hidrólise enzimática, o gráfico de Pareto foi construído utilizando o *software* STATISTICA versão 6.0, permitindo visualizar tanto graficamente como numericamente os efeitos padronizados ou $t_{\text{calculados}}$ de cada variável independente, assim como os de suas interações. Neste gráfico, os efeitos são representados por barras, sendo que apenas aquelas que ultrapassam o valor de 0,05 para o *p-valor* apresentam significância estatística. O valor deste parâmetro garante, com um nível de confiança de 95%, que um determinado fator influencia a variável de resposta analisada (MONTGOMERY & CALADO, 2003).

As Figuras 5.7, 5.8 e 5.9 apresentam os gráficos de Pareto construídos a partir dos resultados dos Delineamentos Compostos Centrais Rotacionais realizados com PM1, PM2 e PM3, respectivamente, mostrando quais variáveis independentes apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre a concentração de glicose, selecionada como variável de resposta, liberada na hidrólise enzimática de cada biomassa.

Em relação a PM1, é possível visualizar que o maior efeito linear e positivo (36,26) foi gerado pela relação S:L, seguida do efeito linear positivo e quadrático negativo da carga enzimática e do efeito da interação entre tais variáveis. O efeito quadrático negativo da relação S:L não apresentou significância estatística a nível de 95% de significância, mas poderia ser considerado marginalmente significativo devido ao *p*-valor (0,063123) estar próximo do valor considerado para este parâmetro (0,05), indicando assim a presença de curvatura. Desta maneira, tanto a relação S:L quanto a carga enzimática tiveram influência sobre a concentração final de glicose.

Baseado no gráfico de Pareto para PM2, pode-se concluir que os maiores efeitos significativos foram gerados pela relação S:L (L) seguida da carga enzimática (L). O efeito quadrático da carga enzimática foi considerado marginalmente significativo, enquanto o efeito da interação entre essas variáveis não apresentou significância estatística.

A partir da análise do gráfico de Pareto (Figura 5.9) para o resíduo PM3, é possível visualizar que o efeito linear da relação S:L foi o único que apresentou influência estatisticamente significativa. O efeito linear gerado pela carga enzimática foi considerado marginalmente significativo, uma vez que seu *p*-valor (0,068466) estava muito próximo do valor considerado (0,05), e, por isso, esta variável não foi descartada. Os efeitos quadráticos da carga enzimática e da relação S:L não foram estatisticamente significativos, mostrando que dentro da faixa estudada, não houve presença de curvatura.

Através das superfícies de respostas geradas pelos modelos obtidos a partir dos resultados dos delineamentos realizados, verificou-se que para PM1 (Figura 5.10), PM2 (Figura 5.11) e PM3 (Figura 5.12), o aumento da relação S:L e da carga enzimática, do nível inferior (-1) para o superior (+1), conduziram a maiores valores finais da concentração de glicose. Através dessas superfícies, foi possível verificar que a hidrólise enzimática não foi otimizada para nenhuma biomassa, uma vez que o ponto máximo da curvatura da superfície não foi alcançado. Isto poderia ter sido obtido se aumentasse o teor de sólidos, porém existe uma restrição operacional causada pelo pequeno volume de meio reacional em relação à quantidade de sólidos, o que dificulta a mistura mecânica e implica numa transferência de massa insuficiente (WU & LEE, 1997).

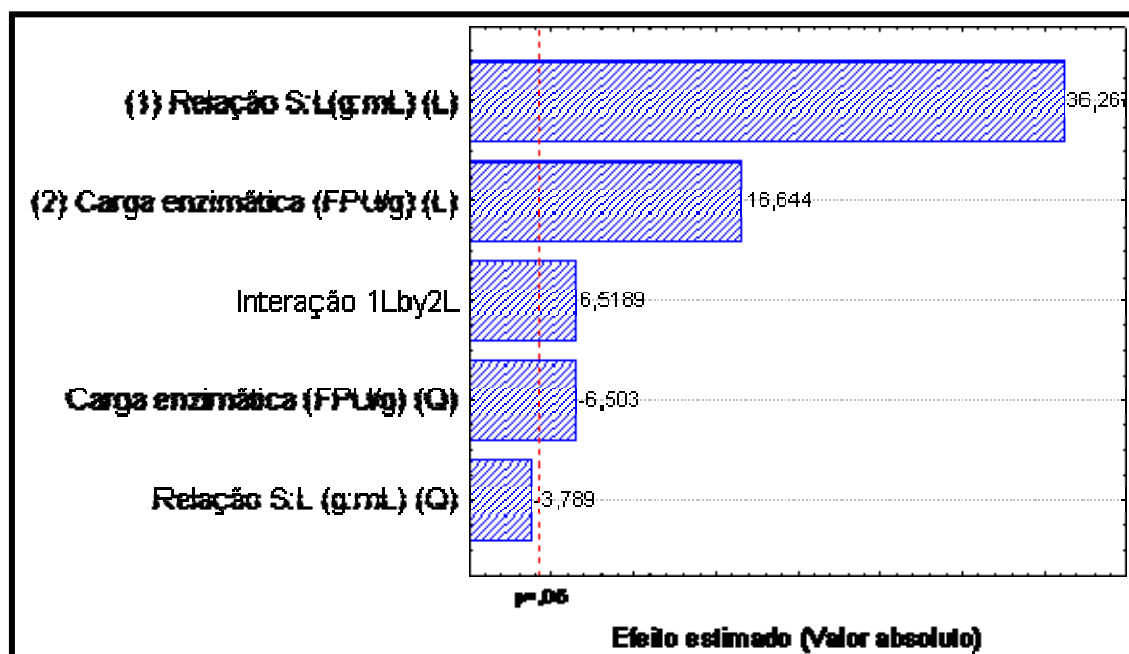


Figura 5.7. Gráfico de Pareto para a concentração de glicose (g/L) como variável de resposta do DCCR para a hidrólise enzimática de PM1

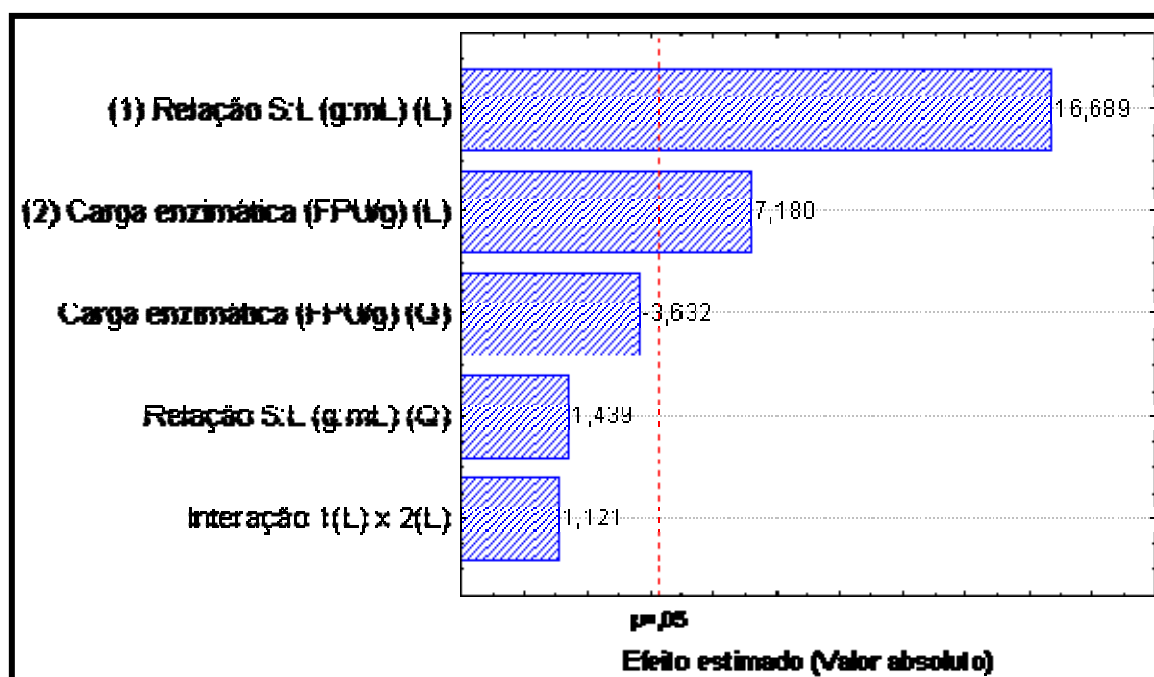


Figura 5.8. Gráfico de Pareto para a concentração de glicose (g/L) como variável de resposta do DCCR para a hidrólise enzimática de PM2

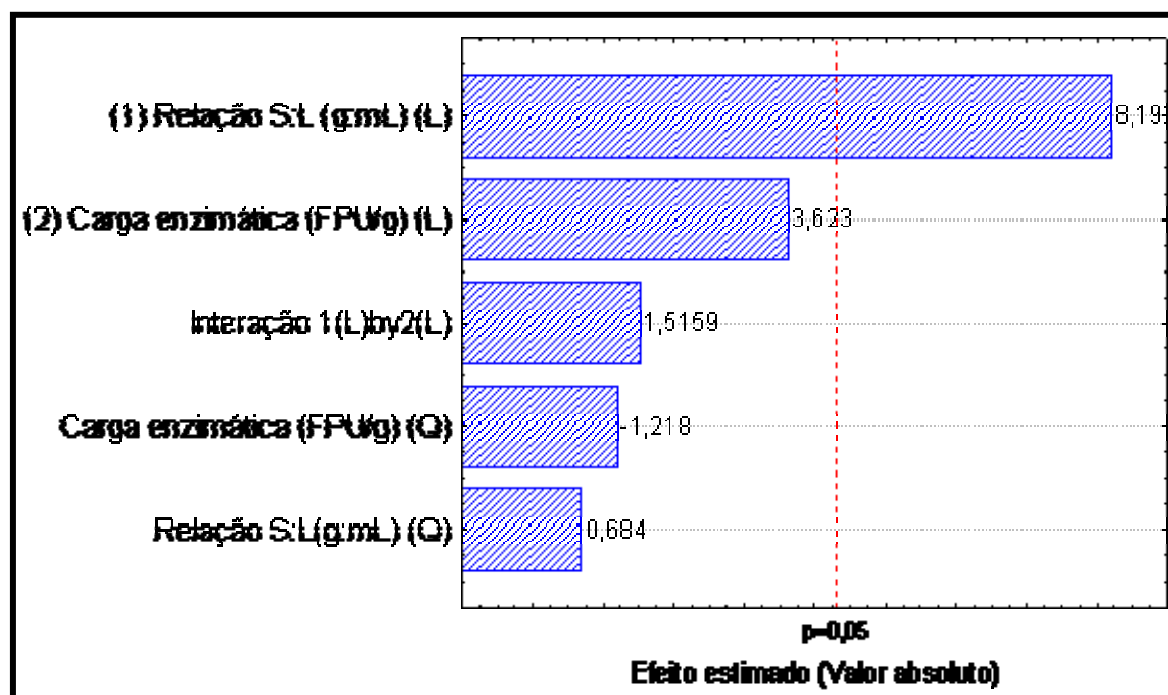


Figura 5.9. Gráfico de Pareto para a concentração de glicose (g/L) como variável de resposta do DCCR para a hidrólise enzimática de PM3

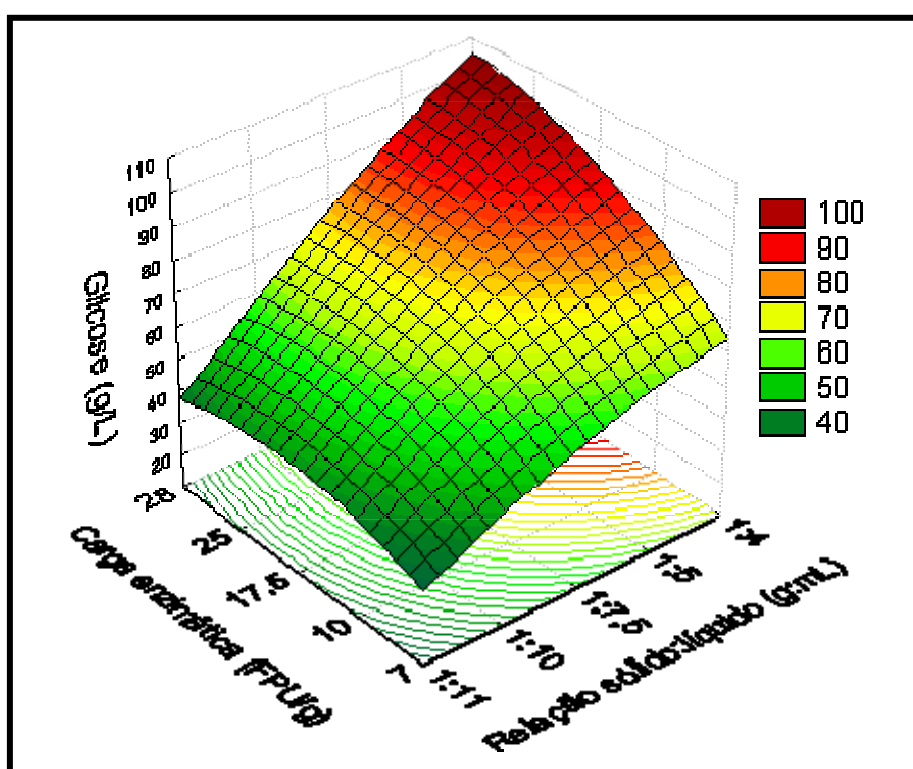


Figura 5.10. Superfície de resposta para a concentração de glicose (g/L) como variável de resposta do DCCR para a hidrólise enzimática de PM1

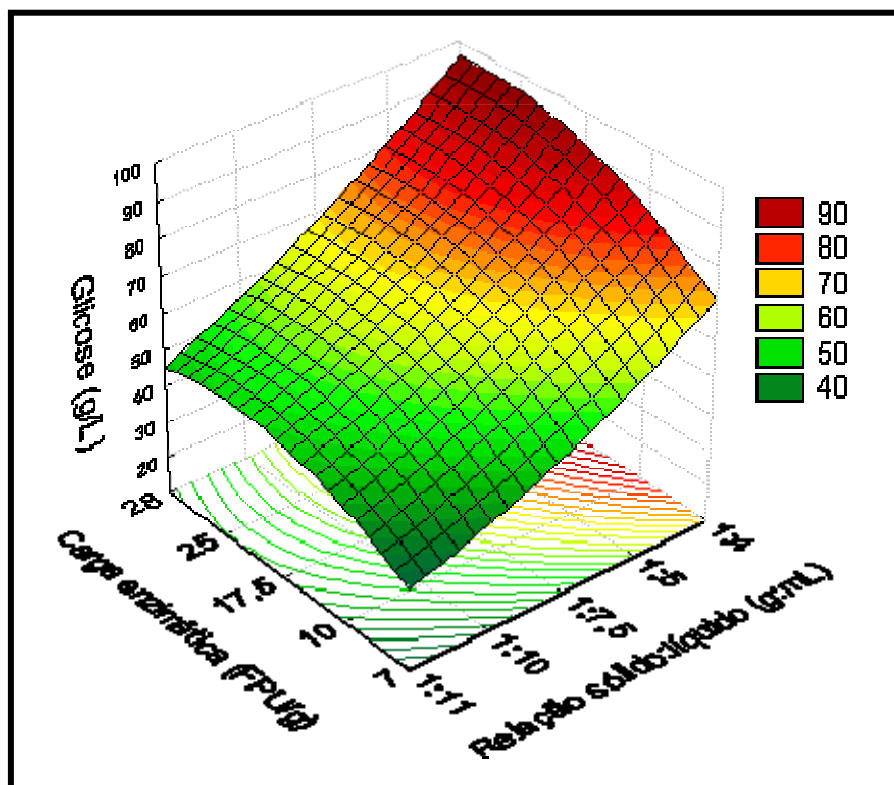


Figura 5.11. Superfície de resposta para a concentração de glicose (g/L) como variável de resposta do DCCR para a hidrólise enzimática de PM2

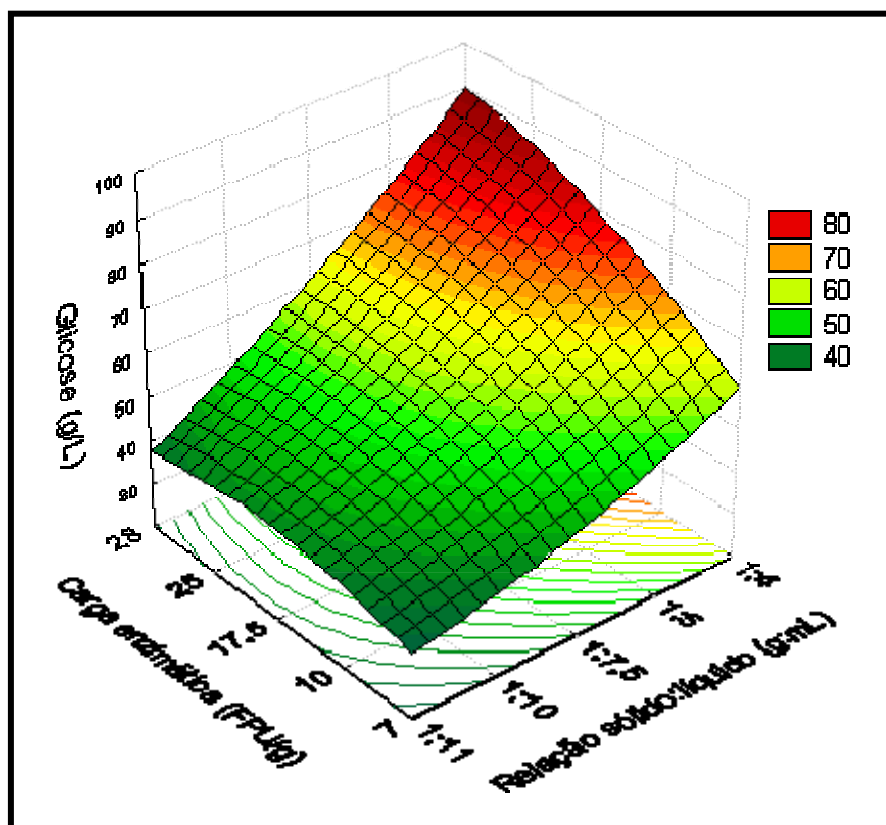


Figura 5.12. Superfície de resposta para a concentração de glicose (g/L) como variável de resposta do DCCR para a hidrólise enzimática de PM3

Na Figura 5.13 é possível visualizar comparativamente o potencial das biomassas PM1, PM2 e PM3 como fonte de glicose.

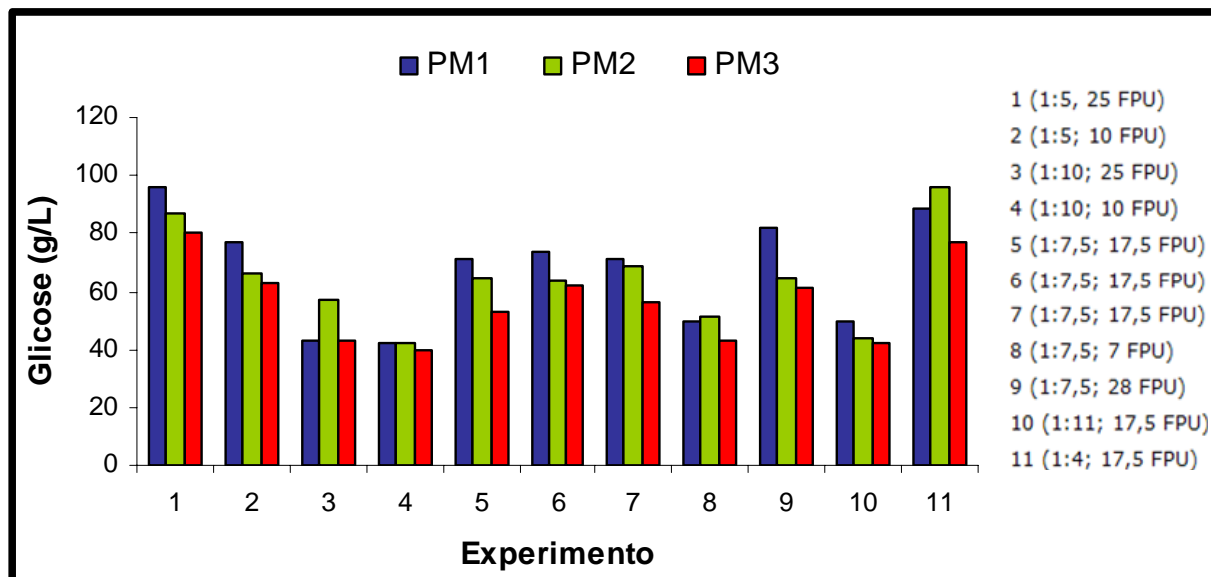


Figura 5.13. Concentração de glicose após hidrólise enzimática de PM1, PM2 e PM3

Ficou evidenciado que as polpas PM1 e PM2 conferiram as maiores concentrações de glicose, obtidas com o experimento 1 e 11, respectivamente. Com a biomassa PM1, logrou-se mais glicose no experimento 1 pelo fato de ter sido usado maior carga enzimática do que no experimento 11. Já para PM2, o fator determinante foi o teor de sólidos, pois mesmo com uma carga de enzimas 30% menor, obteve-se mais glicose no experimento 11 do que no 1. Chama-se atenção que esta biomassa possui um menor teor de lignina do que PM1 (Tabela 5.1).

Em relação ao resíduo PM3, é importante ressaltar que apesar de sua hidrólise ter conferido menor concentração de glicose do que PM1 e PM2, também apresentou grande potencial como fonte de glicose, cuja máxima concentração obtida foi de 80,6 g/L.

Admitindo-se que esse estudo almejou apenas comparar o potencial como fonte de açúcares do resíduo PM3 com o das polpas PM1 e PM2, uma vez que a celulose do resíduo é rejeitada do processo de produção de celulose e a celulose das polpas não, e que PM1 e PM2 são matérias-primas da indústria de celulose, continuou-se a pesquisa apenas com o resíduo PM3.

Baseando-se nos resultados e em todas as análises estatísticas realizadas, determinou-se que as melhores condições para a máxima produção de glicose, dentro da faixa estudada, foram a relação S:L 1:4 e a carga enzimática de 17,5 FPU/g de sólido. Por isso, estas condições foram utilizadas em todas as etapas de pré-hidrólise enzimática dos processos SSF posteriores com PM3.

5.4. PLANEJAMENTO SEQUENCIAL PARA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO SSF

Para a otimização do processo SSF, realizou-se um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) avaliando os efeitos do tempo da pré-hidrólise enzimática e da concentração celular sobre a concentração final de etanol. Sequencialmente, um planejamento univariável foi conduzido variando apenas a concentração celular.

Em todas as etapas de pré-hidrólise enzimática para a otimização do processo SSF, as seguintes condições foram utilizadas:

- ✓ relação S:L 1:4;
- ✓ carga enzimática de 17,5 FPU/g de sólido, utilizando celulasas Multifect;
- ✓ meio tamponado com citrato de sódio e ácido cítrico (pH 5,0);
- ✓ temperatura de 47°C;
- ✓ agitação de 200 rpm.

5.4.1. DCCR

Na Figura 5.14 são apresentados os perfis cinéticos dos processos SSF do DCCR construídos a partir das concentrações de etanol equivalente.

Verifica-se que nos processos cujas maiores concentrações celulares foram utilizadas, o perfil cinético apresentou dois estágios: no primeiro, uma acentuada produção de etanol, indicada por uma maior inclinação das curvas; e no segundo, uma produção de etanol reduzida, indicada por uma inclinação das curvas menor. Este fenômeno, que havia sido primeiramente observado por VASQUEZ *et al.* (2007), foi decorrente de diferentes taxas reacionais de hidrólise e fermentação. No início do processo SSF havia glicose suficiente, não sendo limitado o seu consumo pela levedura. À medida que o processo transcorreu, a alta densidade celular fez

com que a taxa de hidrólise não atendesse plenamente a demanda das células por glicose no segundo estágio, ou seja, a produção de etanol passou a ser limitada pela taxa de liberação de glicose. Ressalta-se que esta concepção de processo, que pode ser denominado de processo híbrido (pré-hidrólise enzimática seguida do processo de hidrólise simultânea a fermentação) garante um consumo de glicose e produção de etanol mais eficientes.

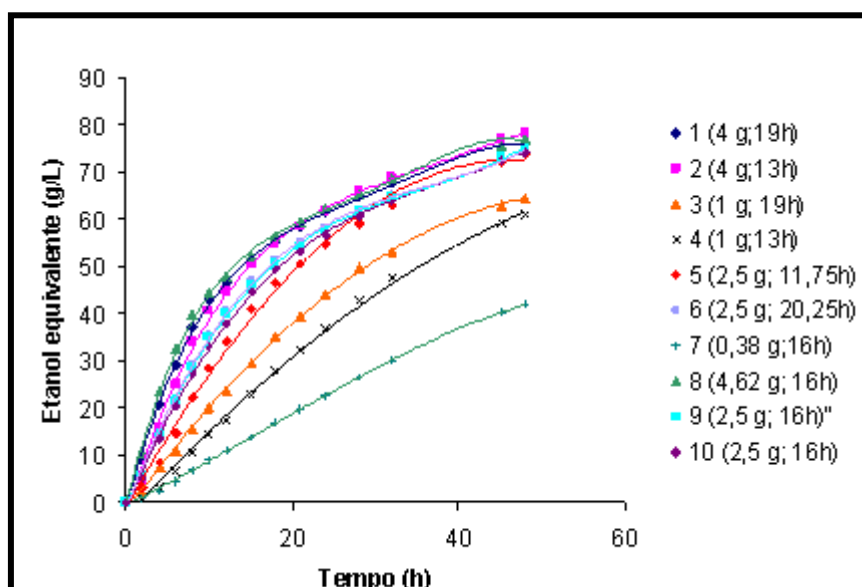


Figura 5.14. Perfis cinéticos dos processos SSF do DCCR para PM3

Vale ressaltar que a taxa de liberação de glicose é maior a 47°C, temperatura na qual é realizada a pré-hidrólise enzimática, do que na temperatura do processo SSF (37°C). Segundo CASTRO *et al.* (2010), as celulases perdem em torno de 15% de suas atividades quando a temperatura é reduzida no processo SSF. A estratégia de se aumentar a temperatura não se aplica a este tipo de processo, já que a atividade microbiana ficaria comprometida e a produção de etanol seria afetada consideravelmente.

Contrariamente, se não houvesse a etapa de pré-hidrólise enzimática, para sistemas inoculados com altas densidades celulares, a taxa de fermentação estaria limitada desde o início do processo, como observado em vários trabalhos publicados na literatura (PHILIPPIDIS & SMITH, 1995; MARTIN *et al.*, 2002; LINDE *et al.*, 2006; RUIZ *et al.*, 2006; JORGENSEN *et al.*, 2010).

A Tabela 5.6 apresenta as concentrações de açúcares, etanol equivalente (determinado pelo desprendimento de CO₂) e etanol (determinado por CLAE) alcançadas após 48h de processo. Verifica-se que as maiores concentrações de etanol foram alcançadas com as maiores concentrações celulares.

Tabela 5.6. Concentração de açúcares no início do SSF e de etanol equivalente, açúcares e etanol no final do processo (48h)

Experimento	Início SSF			Final SSF			
	Concentração (g/L)			Concentração (g/L)			
	ART	Glicose	Celobiose	Glicose	Celobiose	Etanol equiv.	Etanol (CLAE)
1- 4 g/L; 19h	104,4	80,3	1,7	4,6	0,9	76,2	71,7
2- 4 g/L; 13h	81,5	57,4	0,0	4,2	0,0	78,2	70,2
3- 1 g/L; 19h	105,4	71,2	1,4	3,2	0,0	64,5	58,2
4- 1 g/L; 13h	86,6	60,4	4,8	7,9	0,0	60,8	58,2
5- 2,5 g/L; 11,8	81,5	59,9	3,3	4,8	0,9	73,7	72,6
6- 2,5 g/L; 20,2	108,2	83,6	2,8	4,2	0,9	74,2	67,6
7- 0,38 g/L; 16h	101,5	73,8	1,8	6,6	0,9	42,0	52,7
8- 4,6 g/L; 16h	101,1	69,7	2,1	4,4	1,1	77,0	77,6
9 (C)- 2,5 g/L; 16h	101,1	78,1	2,4	4,4	0,9	74,9	65,1
10(C)- 2,5 g/L; 16h	99,0	69,9	2,3	4,3	1,0	74,0	66,2

(C) – Ponto central; Etanol equiv. – Etanol equivalente

Por esta dissertação apresentar um alto grau de originalidade, uma vez que não se encontra na literatura trabalhos que reportem a utilização do resíduo do sistema de decantação da indústria de celulose para a produção de bioetanol de segunda geração através do processo SSF, fez-se necessário comparar o potencial deste resíduo com o de outros industriais para a produção desse biocombustível utilizando a mesma concepção de processo.

Com o tempo de 20,2 h de pré-hidrólise enzimática logrou-se a máxima concentração de glicose, 83,6 g/L. Esta concentração foi muito superior àquela reportada por VÁSQUEZ *et al.* (2007) (Tabela 2.7), que obtiveram 58,4 g/L de glicose após 12 h de pré-hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, empregando celulasas comerciais com carga enzimática superior (25,9 FPU/g) e teor de sólido menor (10%).

SANTOS *et al.* (2010) (Tabela 2.7) alcançaram 76 g/L de glicose após 12 h de pré-hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, porém com uma carga enzimática (25,0 FPU/g) e teor de sólidos (23 %) maiores do que aqueles

utilizados neste trabalho (17,5 FPU/g e 20%, respectivamente). Vale ressaltar que quanto menor a carga enzimática utilizada, menor será o custo total do processo.

ZHANG *et al.* (2009) (Tabela 2.7) realizaram uma pré-hidrólise de 48 h com sabugo de milho, empregando 8,0 FPU/g de carga enzimática e 12,5% de teor de sólidos, e alcançou uma média de 0,205 g de açúcares redutores para cada grama de sabugo hidrolisado, duas vezes menor daquela alcançada no experimento 6, cujas condições permitiram alcançar 0,43 g de ART para cada grama de PM3 processado.

Estes resultados mostraram o grande potencial do resíduo PM3 como fonte de açúcares quando comparado com outras biomassas utilizadas nos trabalhos apresentados anteriormente.

Com o experimento 8 alcançou-se a maior concentração de etanol, 77,6 g/L, equivalendo a uma produtividade volumétrica de 1,62 g/L.h. WINGREN *et al.* (2005), que realizaram um processo SSF com madeira de *Piceas abies*, empregaram *S. cerevisiae* de panificação como inóculo, cuja concentração celular (5,0 g/L) foi muito próxima daquela utilizada no experimento 8 (4,62 g/L), obtendo apenas 26 g/L de etanol após 55 h de fermentação, realizando também uma pré-hidrólise enzimática de 16 h, mas resultando em uma produtividade volumétrica de 0,37 g/L.h.

Os resultados obtidos no experimento 8 também foram muito superiores daqueles obtidos por ÖHGREN *et al.* (2007) (Tabela 2.7), que realizaram uma pré-hidrólise enzimática de 16 h com palha de milho, seguida do processo SSF que foi conduzido por 80 h, no qual utilizaram 1 g/L de *S. cerevisiae* de panificação e alcançaram uma concentração final de etanol de 26,7 g/L.

Para a análise estatística dos resultados obtidos no DCCR, além do gráfico de Pareto (Figura 5.15), também foi utilizada como ferramenta a análise da variância (ANOVA) (Tabela 5.7). Em ambos os casos foram incluídos todos os efeitos: lineares (L); quadráticos (Q); e a interação entre as duas variáveis.

Na análise de variância (Tabela 5.7) podem ser observados os valores do desvio quadrático provocado por cada variável (Soma quadrática – SQ) e seu grau de liberdade correspondente (GL). Com esses parâmetros é calculada a média quadrática (MQ), que dividida pelo erro puro experimental, permite a determinação do parâmetro F e, subsequentemente, do p -valor, utilizados na verificação da

hipótese nula. Altas ordens de magnitude dos parâmetros SQ, MQ e F , geradores de p -valor $<0,05$, indicam uma influência significativa da variável sobre a concentração final de etanol.

A ANOVA, assim como o gráfico de Pareto, mostrou que o único efeito significativo estatisticamente foi gerado pela concentração celular, que apresentou uma SQ com ordem de grandeza duas vezes maior que a dos outros parâmetros, gerando um valor de F superior ao tabelado com um p -valor significativo, considerando 95% de confiança. Entretanto, os efeitos, tanto linear quanto quadrático, do tempo de pré-hidrólise enzimática não apresentaram significância estatística, cujos valores de SQ foram baixos, gerando valores de p -valor muito acima de 0,05. Apesar do efeito da concentração celular ter sido o único que apresentou significância estatística, o modelo apresentou um coeficiente de determinação alto ($R^2=0,924$), inclusive com uma falta de ajuste não significativa e um erro puro baixo quando comparado com os resultados do planejamento experimental.

A superfície de resposta para a concentração de etanol como variável de resposta é apresentada na Figura 5.16. Verificou-se que maiores concentrações celulares deveriam ser empregadas a fim de se obterem maiores concentrações de etanol. Considerando que o efeito do tempo de pré-hidrólise enzimática não foi estatisticamente significativo, o menor tempo deveria ser selecionado, porém o hidrolisado liquefez com 16 h e somente com este tempo foi operacionalmente viável utilizar o hidrolisado e inocular o microorganismo fermentador.

Tabela 5.7. Análise de variância (ANOVA) para concentração final de etanol do DCCR

Efeito	SQ	GL	MQ	F	p -valor
(1) Concentração celular (L)	460,77*	1*	460,77*	761,61*	0,023058*
Concentração celular (Q)	4,69	1	4,69	7,74	0,219593
(2) Tempo PHE (L)	3,88	1	3,88	6,41	0,239433
Tempo PHE (Q)	9,78	1	9,78	16,16	0,155207
Interação 1x2	0,56	1	0,56	0,93	0,511590
Falta de ajuste	39,58	3	13,19	21,81	0,155828
Erro puro	0,60	1	0,60		
Total	530,23	9			

$R^2 = 0,924$

(*) Fator com significância estatística; PHE – pré-hidrólise enzimática

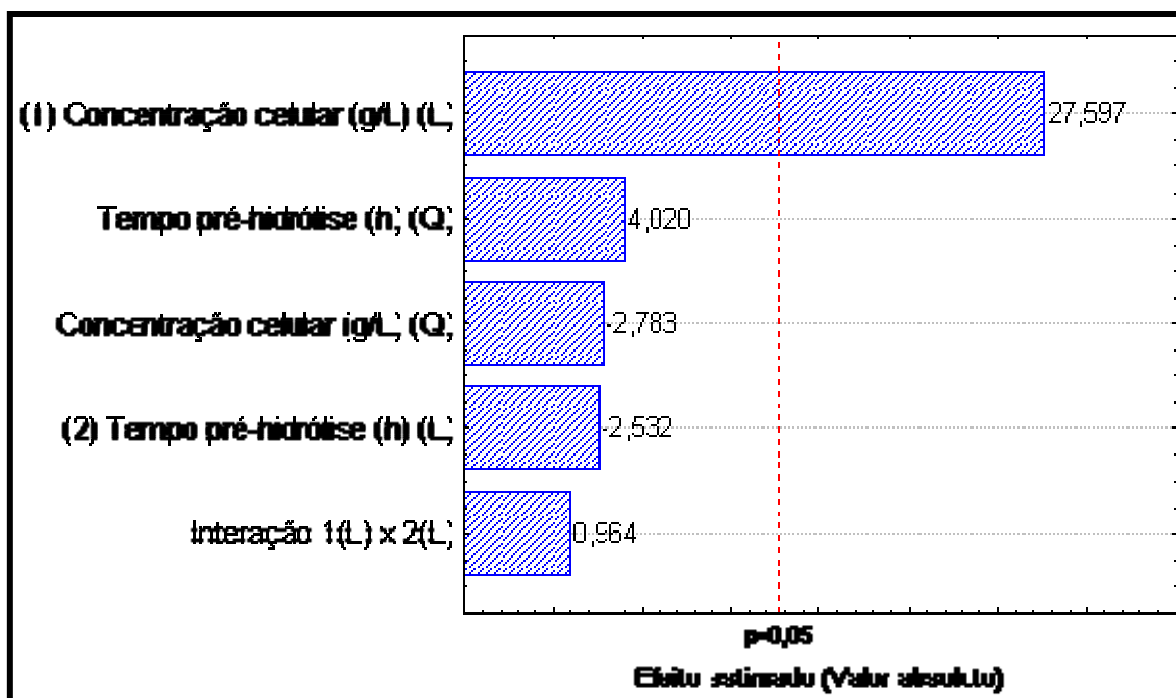


Figura 5.15. Gráfico de Pareto para a concentração de etanol (g/L) como variável de resposta do DCCR para o SSF de PM3

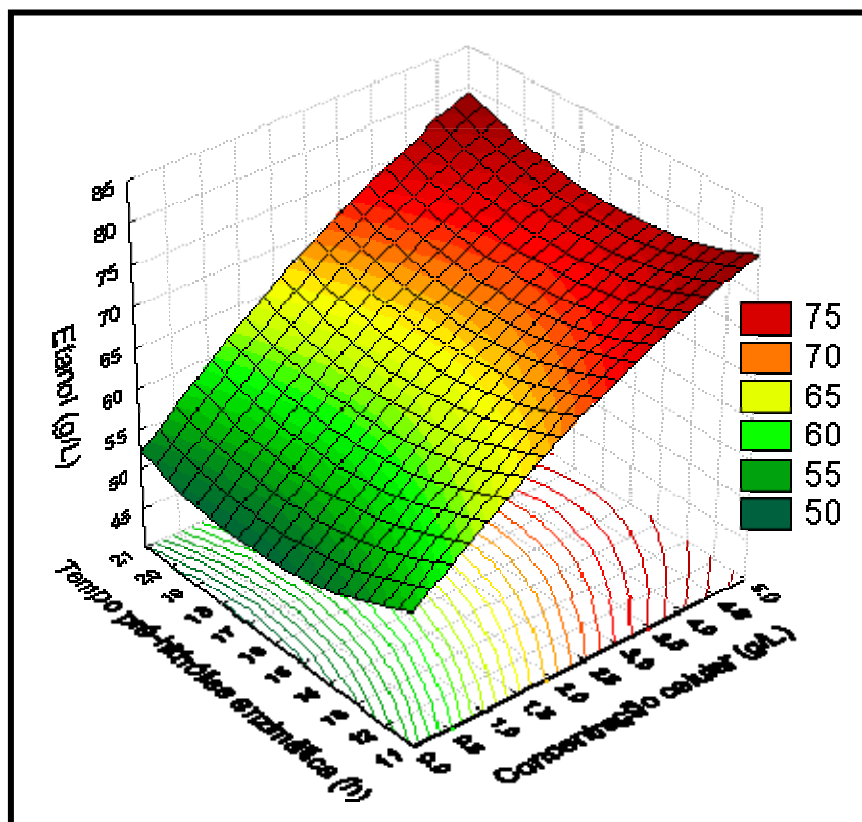


Figura 5.16. Superfície de resposta para concentração de etanol (g/L) como variável de resposta do DCCR para o SSF de PM3

Baseando-se nos resultados obtidos e na análise de dados realizada, determinou-se que a melhor condição dentro da faixa estudada nesse DCCR para o processo SSF com PM3 foi a concentração celular de 4,62 g/L e o tempo de pré-hidrólise de 16 h. Porém, fez-se necessário realizar um planejamento experimental univariável, ampliando a faixa da concentração celular visando o aumento da concentração de etanol. Além disso, verificou-se na Figura 5.14 que a redução do tempo de processo de 48 h para 36 h resultaria numa perda de aproximadamente 10% de etanol, porém ao reduzir o tempo em 12 horas, poder-se-ia aumentar a produtividade final. Assim, determinou-se que os processos SSF realizados sequencialmente finalizariam com 36 h.

A Figura 5.17 mostra as diferentes etapas do processo do experimento 8 (4,6 g/L e 16 h), ilustrando a liquefação da biomassa PM3 após a hidrólise enzimática.

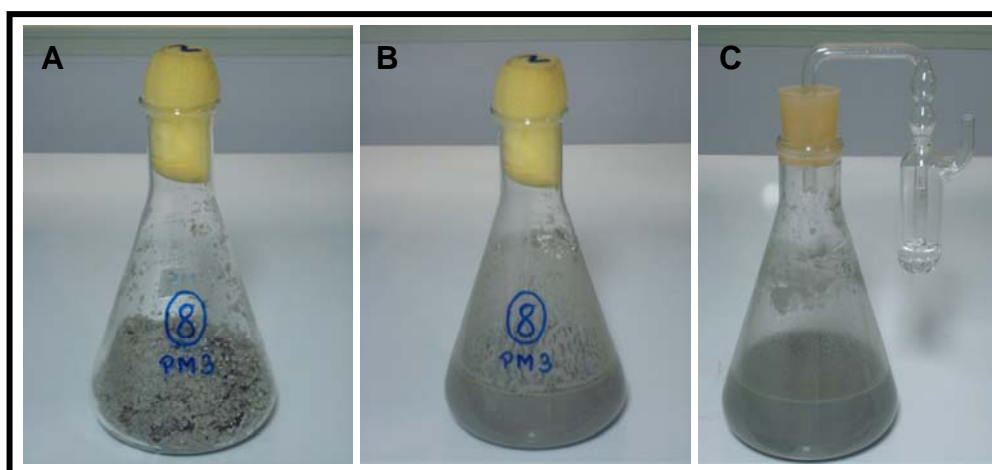


Figura 5.17. Experimento 8 do DCCR para SSF de PM3. Condições: relação S:L 1:4, 17,5 FPU/g, 16 h pré-hidrólise enzimática, 4,6 g/L inóculo, 48 h fermentação. A - início da pré-hidrólise enzimática. B - final da pré-hidrólise enzimática. C - final do processo SSF

5.4.2. Planejamento univariável

No planejamento univariável, a variável independente foi a concentração celular, cuja faixa estudada variou de 2,0 g/L a 10,0 g/L, e a variável dependente ou de resposta foi a concentração final de etanol.

A Figura 5.18 apresenta os perfis cinéticos do processo SSF para diferentes concentrações iniciais de células. A análise desta figura mostra que à semelhança

dos processos fermentativos clássicos para a produção de etanol, a taxa fermentativa é fortemente influenciada pelo tamanho do inóculo, facilmente verificado no início do processo SSF. Considerando o tempo de 6 h de fermentação, verificou-se de maneira mais acentuada que uma maior concentração de etanol equivalente era alcançada à medida que se empregava maior concentração celular. Desta maneira, a produtividade volumétrica neste tempo (Q_{pi}), considerando a concentração de etanol equivalente, aumentou consideravelmente com o aumento do tamanho do inóculo. As Q_{pi} obtidas com 2,0 g/L, 4,0 g/L, 6,0 g/L, 8,0 g/L e 10 g/L foram 1,8 g/L.h, 2,6 g/L.h, 4,8 g/L.h, 5,2 g/L.h, e 6,5 g/L.h, respectivamente. Tais resultados condizem com os dados na literatura, os quais também relataram que maiores concentrações de levedura permitiram fermentações mais rápidas (com maior Q_p) (LIMA *et al.*, 2001).

As produtividades volumétricas alcançadas no final do processo (Q_{pf}) no experimento 1, 2, 3, 4 e 5, considerando o etanol equivalente, foram 1,68 g/L.h, 1,93 g/L.h, 1,98 g/L.h, 2,09 g/L.h e 2,10 g/L.h, respectivamente. Ao verificar a redução da diferença entre as Q_{pf} alcançadas com cada concentração celular, constatou-se que, quando se utilizou alta densidade celular, a taxa fermentativa no segundo estágio do processo, discutido no item 5.4.1, também foi limitada pela liberação de glicose pelas enzimas do complexo celulásico. O mesmo não ocorreu no experimento 1, no qual foram utilizadas 2,0 g/L células, indicando que a taxa de liberação de glicose atendeu bem a taxa fermentativa quando o tamanho do inóculo era baixo.

Segundo LIMA *et al.* (2001), o uso de maior concentração celular não somente aumenta a produtividade volumétrica, mas também aumenta o controle sobre as bactérias contaminantes e restringe o crescimento da própria levedura. Por outro lado, elevado teor de levedura exige maior consumo de açúcar para manter as células vivas, além de resultar em maior competição pelos nutrientes do meio, diminuindo a viabilidade do fermento.

A Figura 5.19 permite comparar facilmente a concentração de etanol equivalente e etanol, determinada por CLAE, obtida em cada experimento e sua respectiva concentração celular, mostrando que o emprego de um sistema simples de fermentação, denominado de fermentômetro, permitiu avaliar o desempenho de diferentes experimentos de maneira rápida e eficiente. Os valores de etanol

equivalente, calculado através de uma relação estequiométrica, apresentam correspondência com as concentrações de etanol determinadas analiticamente por CLAE.

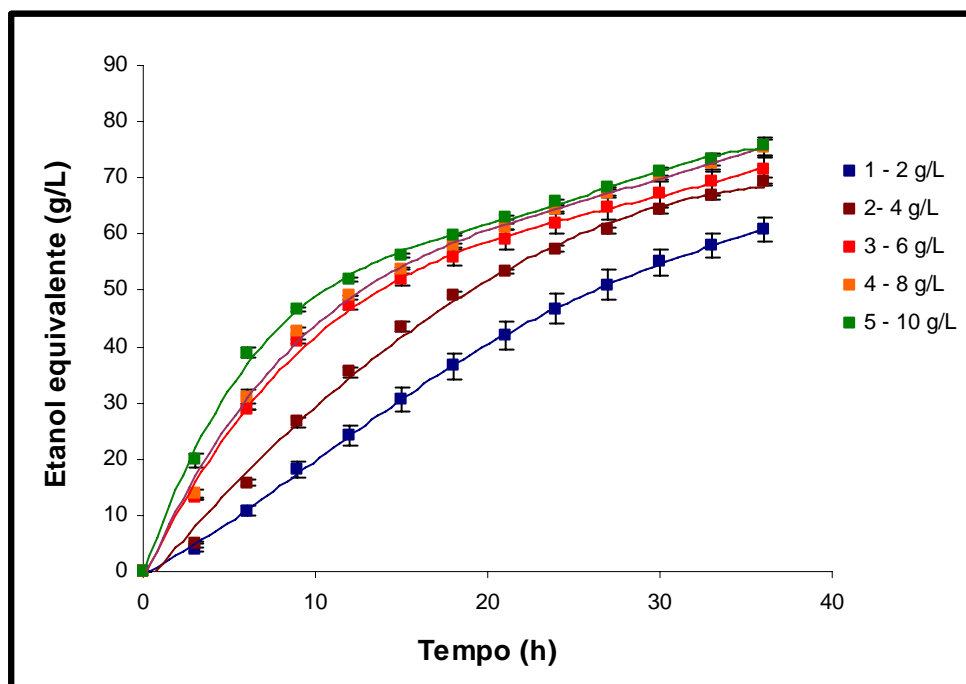


Figura 5.18. Perfis cinéticos de SSF do planejamento univariável

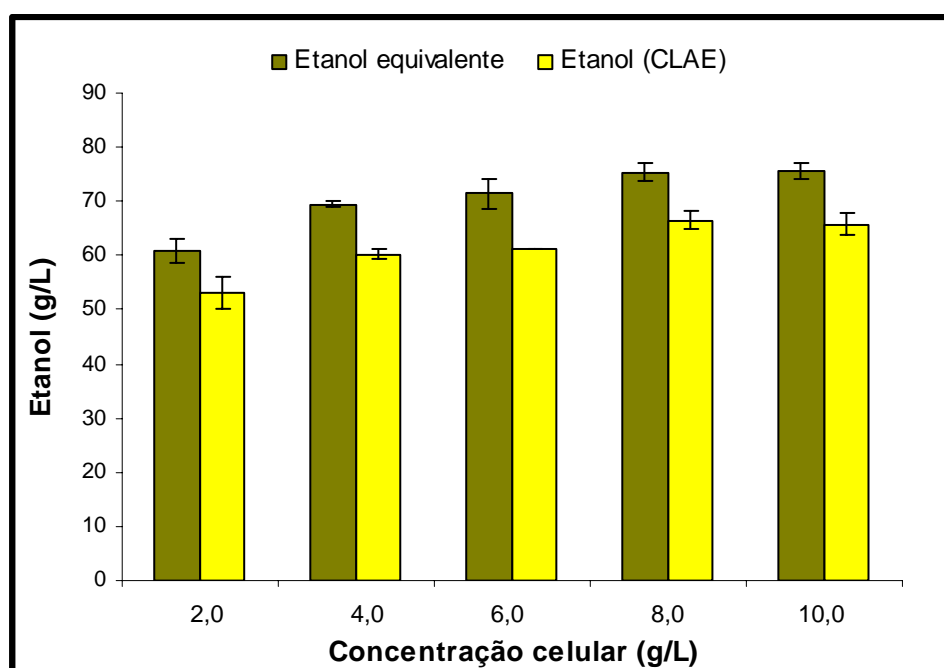


Figura 5.19. Concentrações de etanol equivalente e etanol (CLAE) do planejamento univariável

A Tabela 5.8 sumariza as concentrações de açúcares (iniciais e finais), etanol (CLAE) e etanol equivalente dos experimentos de hidrólise enzimática e fermentação silmultânea do planejamento univariável.

Verificou-se que a concentração final de etanol aumentou à medida que se empregou maior concentração celular; porém, este aumento não ocorreu quando a concentração de inóculo passou de 8 g/L para 10 g/L, indicando que maior concentração de etanol não seria alcançada se aumentasse ainda mais o tamanho do inóculo. Isto está associado à tolerância das células de levedura ao principal produto do metabolismo fermentativo. Desta maneira, conclui-se que a partir de 8 g/L, o tamanho do inóculo não foi o fator que mais influenciou a variável de resposta, e sim a taxa de liberação de glicose pelas celulases, não havendo necessidade de impactar o sistema fermentativo com mais células.

Tabela 5.8. Concentração de açúcares no início do SSF e de etanol equivalente (equival.), açúcares e etanol no final dos processos SSF (36h) do planejamento univariável

Experimento	Início SSF			Final SSF			
	Concentração (g/L)			Concentração (g/L)			
	ART	Glicose	Celobiose	Glicose	Celobiose	Etanol equival.	Etanol (CLAE)
1- 2,0 g/L	95,5	71,6	6,5	4,4	0,0	60,9	53,1
2- 4,0 g/L	92,6	70,1	6,1	1,8	0,0	69,5	60,2
3- 6,0 g/L	94,0	73,6	6,9	1,1	0,0	71,4	61,2
4- 8,0 g/L	95,8	73,6	6,9	0,8	0,0	75,4	66,6
5- 10,0 g/L	100,4	73,9	6,6	0,6	0,0	75,6	65,8

Baseando-se em todos os resultados obtidos, concluiu-se que as condições do processo SSF foram otimizadas e que as mesmas conferiram uma concentração máxima de etanol de 66,6 g/L em 36 h, correspondendo a uma produtividade volumétrica de 1,85 g/L.h.

A eficiência do processo otimizado mostrou-se excelente quando se comparou a concentração final de etanol alcançada neste trabalho e o tempo do processo SSF com a de outros trabalhos relatados na literatura que empregaram levedura de panificação (Tabela 2.7). STENBERG *et al.* (1999) alcançaram apenas 25 g/L de etanol empregando a estratégia SSF com 96 h utilizando a madeira de *Picea abies*, pré-tratada com explosão com vapor catalisada (SO₂), carga de celulases de 32 FPU/g e carga adicional de β-glucosidase de 28 UI/mL,

concentração celular de 7,5 g/L, similar daquela deste trabalho, e inóculo de *S. cerevisiae* de panificação.

XU *et al.* (2009) desenvolveram um processo SSF com selagem de milho, que foi submetido a um pré-tratamento hidrotérmico e pré-hidrólise de 24 h, com carga enzimática de 30 FPU/g. Neste processo, também se empregou *S. cerevisiae* de panificação (0,2 g/L), porém logrou-se somente 20 g/L de etanol em um tempo total de processo (194 h) quatro vezes maior e uma produtividade volumétrica (0,1 g/L.h), aproximadamente, doze vezes menor daqueles obtidos neste trabalho, 52 h e 1,14 g/L.h, respectivamente.

WINGREN *et al.* (2005) e ÖHGREN *et al.* (2007), cujos trabalhos foram apresentados anteriormente, alcançaram concentrações de etanol bem menores, 26,0 g/L em 71 h e 26,7 g/L em 96 h de SSF, respectivamente, e também realizaram pré-tratamento (explosão com vapor catalisada - SO₂).

É importante ressaltar que, além desses trabalhos apresentarem concentrações de etanol e produtividades muito menores, nos processos com estas biomassas, madeira de *Picea abies*, selagem e palha de milho, foram realizados pré-tratamentos, etapa desnecessária na produção de etanol a partir de uma biomassa residual da indústria de celulose (PM3), o que a coloca em uma posição muito favorável.

Visando garantir a reprodutibilidade do processo SSF em frascos agitados, fez-se necessário validar as melhores condições do processo SSF com o resíduo PM3, citadas a seguir:

- ✓ relação S:L 1:4;
- ✓ carga enzimática de 17,5 FPU/g sólido, utilizando celulasas Multifect;
- ✓ tempo de pré-hidrólise enzimática de 16h;
- ✓ 8 g/L de *S. cerevisiae* de panificação;
- ✓ 36 h de processo.

5.4.3. Validação das melhores condições do processo SSF em frascos agitados

A Figura 5.20 apresenta o perfil cinético do processo SSF de PM3, realizado em 4 réplicas, utilizando as melhores condições, descritas anteriormente, para esse processo. A Tabela 5.9 apresenta as concentrações de açúcares, etanol e etanol equivalente (fermentômetro) no início e final do SSF. Tais resultados mostraram claramente que as melhores condições do processo SSF com o resíduo PM3 foram validadas, corroborando a reprodutibilidade do processo em frascos agitados.

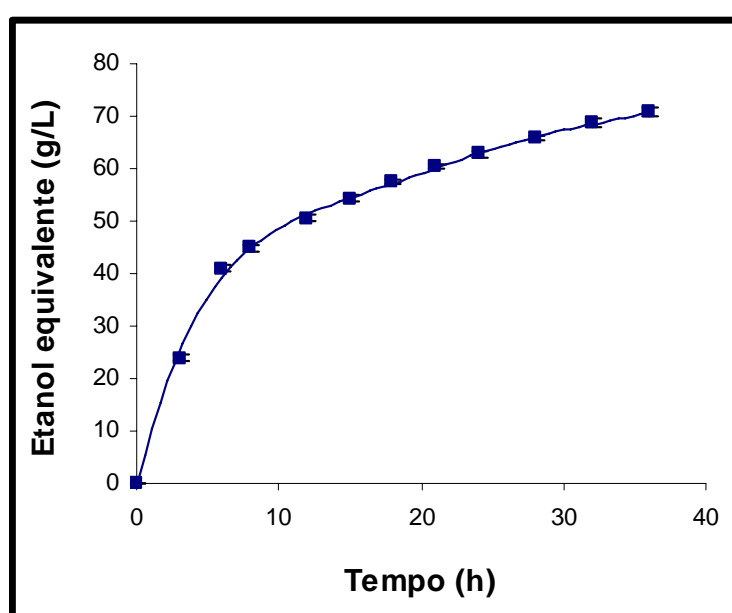


Figura 5.20. Perfil cinético do SSF na validação das melhores condições do processo SSF com PM3 em frascos agitados. Condições: relação S:L 1:4, carga enzimática de 17,5 FPU/g, tempo de pré-hidrólise enzimática de 16 h e 8 g/L inóculo

Tabela 5.9. Concentração de açúcares no início do SSF e de etanol equivalente (equiv.), açúcares e etanol no final do SSF (36h) na validação das melhores condições: relação S:L 1:4, carga enzimática de 17,5 FPU/g, tempo de pré-hidrólise enzimática de 16 h e 8 g/L inóculo

Início SSF			Final SSF			
Concentração (g/L)			Concentração (g/L)			
ART	Glicose	Celobiose	Glicose	Celobiose	Etanol equiv.	Etanol (CLAE)
93,8	73,7	7,1	0,0	1,1	70,1	65,0

Em todos os experimentos realizados até a validação das melhores condições do SSF foi utilizada a levedura *S. cerevisiae* de panificação. Porém, segundo CHERUBIN (2003), a utilização de levedura de panificação em processos fermentativos propicia a contaminação bacteriana, que seria oriunda da própria massa celular. Além disso, visando à produção em escala industrial, a levedura de panificação é considerada menos resistente às substâncias tóxicas, como o alumínio, que podem ser encontradas no caldo fermentativo industrial e reduzem significativamente a viabilidade e a taxa de fermentação desta levedura (ARANHA 2002).

Desta forma, decidiu-se dar continuidade ao trabalho empregando uma linhagem industrial de *S. cerevisiae*, codificada como JP1, como agente fermentativo do processo SSF do resíduo PM3.

5.5. PROCESSOS SSF CONDUZIDOS EM BIORRETAOR

Nesta seção são apresentados os resultados dos processos SSF conduzidos em biorreataor instrumentado. Três condições foram ensaiadas, a saber: processo SSF utilizando *S. cerevisiae* JP1 e celulasas Multifect; SSF empregando *S. cerevisiae* JP1 e celulasas LADEBIO, visando comparar o desempenho dessas celulasas com o das enzimas Multifect; e SSF com enzimas comerciais e hidrolisado suplementado com fontes de nitrogênio, fosfato e sais minerais, a fim de avaliar a importância da suplementação na produção de bioetanol.

5.5.1. Processo SSF empregando a linhagem industrial *S. cerevisiae* JP1 e celulasas comerciais Multifect

A fim de se obter a concentração de inóculo desejada (8,0 g/L) da levedura *S. cerevisiae* JP1 em menor tempo, empregando-se apenas um vaso e não vários frascos cônicos, realizou-se a propagação das células em biorreataor. Para isso, utilizou-se 10% do pré-inóculo crescido por 12 h em frascos cônicos agitados de acordo com a metodologia descrita no item 4.31. A propagação do pré-inóculo por

12 h foi determinada uma vez que neste tempo as células ainda se encontravam em fase de crescimento, como pode ser visualizado na Figura 5.21.

Como a obtenção de grande massa celular no biorreator necessitava de alta concentração de substrato (glicose), que não poderia ser fornecida em sua totalidade no início do crescimento do inóculo, realizou-se, portanto, uma batelada alimentada com pulsos. A concentração inicial de glicose no meio de cultura (Tabela 4.2) foi de 35 g/L, tendo sido necessária apenas uma alimentação com solução de glicose concentrada (800 g/L) a fim de se aumentar a concentração deste açúcar para 20 g/L e alcançar a concentração celular desejada.

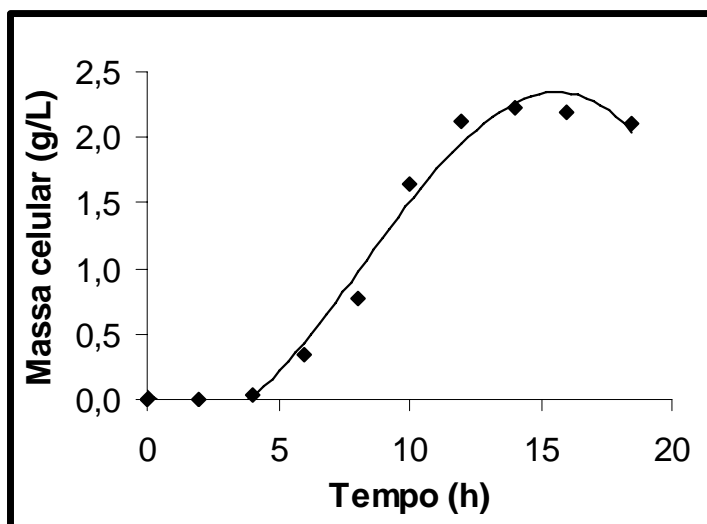


Figura 5.21. Cinética do pré-inóculo de *S. cerevisiae* JP1

A Figura 5.22 apresenta o perfil de crescimento da levedura *S. cerevisiae* JP1 em biorreator. É importante ressaltar que a utilização do pré-inóculo contribuiu para a curva de crescimento não apresentar fase lag, período em que ocorre pouca ou nenhuma divisão celular. O mesmo não ocorreu na curva de crescimento do pré-inóculo (Figura 5.21), na qual a duração da fase lag foi de 4 horas, pois as leveduras se encontravam em estado de latência, uma vez que não se reproduziram imediatamente ao serem inoculadas em um meio de cultura com composição química diferente. Nessa fase, a população fúngica passou por um período de intensa atividade metabólica, principalmente síntese de enzimas e de moléculas variadas.

A produtividade volumétrica em células atingida na propagação realizada em biorreator foi 0,91 g/L.h, cinco vezes maior daquela apresentada no crescimento do pré-inóculo (0,19 g/L.h). Baseando-se nesses dados, verificou-se que a estratégia de crescer *S. cerevisiae* JP1 em biorreator mostrou-se extremamente eficaz, uma vez a obtenção de grande massa celular em um curto período de tempo também implica na redução do custo total do processo.

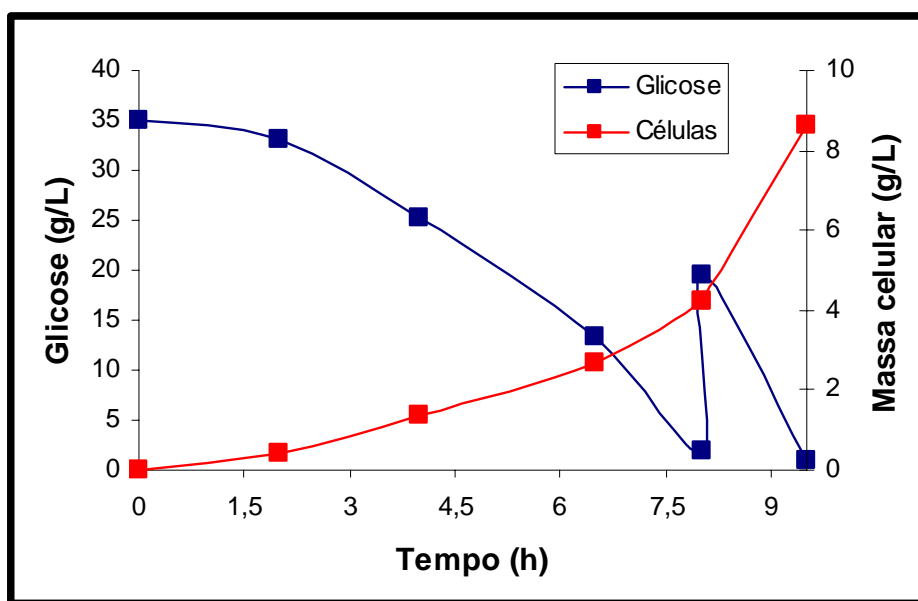


Figura 5.22. Cinética do crescimento de *S. cerevisiae* JP1 em biorreator

O perfil cinético obtido do processo SSF utilizando *S. cerevisiae* JP1 e celulasas Multifect é apresentado na Figura 5.23. A partir dessa cinética pode-se deduzir que um tempo de 16 h não foi demasiado para a pré-hidrólise enzimática, pois se pode observar claramente que, até a etapa de inoculação com a levedura, a liberação da glicose pelas celulasas foi monotonicamente crescente. Verifica-se que a concentração de celobiose durante o processo manteve-se próxima de 6,0 g/L, concentração muito inferior daquela alcançada em fermentações relatadas na literatura, nas quais celulasas comerciais também foram utilizadas, mas com carga adicional de β -glucosidase (WINGREN *et al.*, 2005; LINDE *et al.*, 2006; RUIZ *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2010).

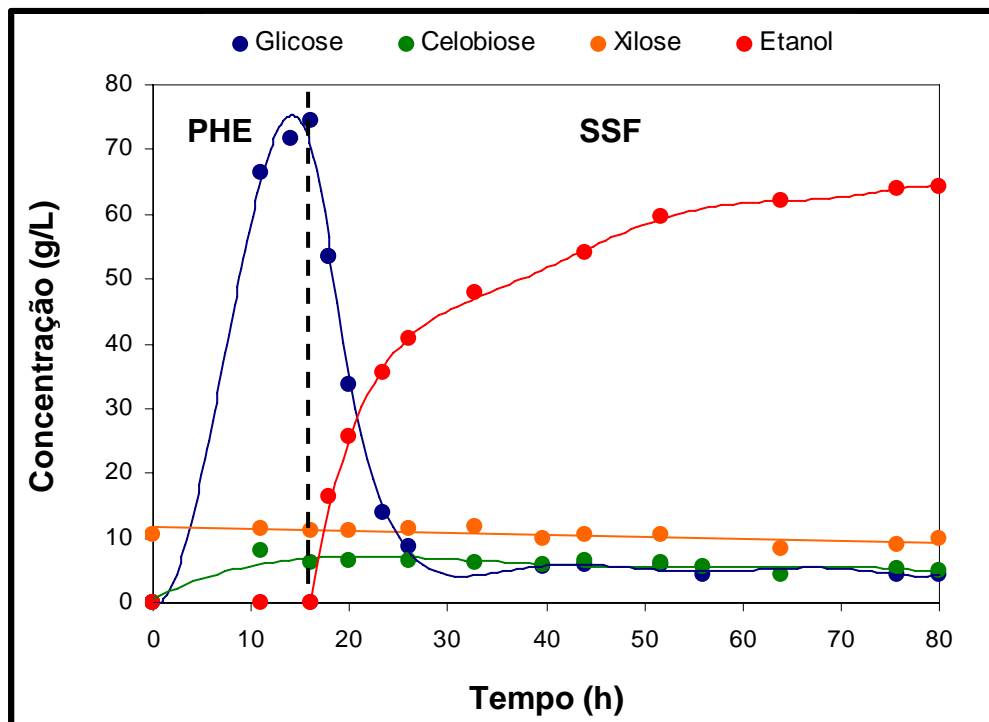


Figura 5.23. Perfil cinético do processo SSF de PM3 em biorreator empregando *S. cerevisiae* JP1 e celulases Multifect. Condições: relação S:L 1:4, carga enzimática de 17,5 FPU/g, tempo de PHE de 16 h e 8 g/L de inóculo
PHE – Pré-hidrólise enzimática

A taxa de produção de etanol sofreu redução a partir do tempo de 24 horas e manteve-se praticamente constante até o final do processo, quando foi alcançada a concentração de 64,4 g/L de etanol.

A concentração final de etanol obtida no processo SSF de PM3 empregando-se linhagem industrial de *S. cerevisiae* foi muito superior do que aquelas relatadas em vários processos SSF na literatura (MARTIN *et al.*, 2002; LINDE *et al.*, 2006; RUIZ *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2010) (Tabela 2.7).

KANG *et al.* (2010) realizaram um processo SSF com lama de cal proveniente da indústria de celulose para a produção de bioetanol de segunda geração. Neste trabalho, o resíduo não foi submetido a pré-tratamento nem a etapa de pré-hidrólise enzimática. Empregando celulases (15 FPU/g), β -glucosidases (30 UI/mL), 6% de teor de sólidos e 0,05 g/L de *S. cerevisiae*, alcançaram apenas 45 g/L de etanol após 150 h de processo.

RUIZ *et al.* (2010) produziram bioetanol a partir de madeira de oliva e caule de girassol, submetendo-os a pré-tratamentos com explosão a vapor catalisada

(SO₂) e deslignificação com peróxido alcalino, sem realizar pré-hidrólise enzimática e utilizando *S. cerevisiae* com inóculo. Somente após 72 h de processo, alcançaram apenas 20,9 g/L e 29,4 g/L de etanol com caule de girassol e madeira de oliva, respectivamente

LINDE *et al.* (2006) alcançaram 25 g/L de etanol após 120 h de processo SSF realizado com palha de cevada. Enquanto MARTIN *et al.* (2002) obtiveram após 48 h de SSF apenas 12 g/L de etanol produzido a partir de bagaço de cana. ZHU *et al.* (2010) relataram que alcançaram 41,8 g/L de etanol a partir de cavaco de pinus, que foi submetido a pré-tratamento com H₂SO₄ e NaHSO₄, empregando 2,0 g/L de *S.cerevisiae*, porém não explicitaram o tempo do processo.

A Tabela 5.10 sumariza as concentrações de açúcares e etanol no início e final do processo com PM3. É importante verificar que a concentração de xilose manteve-se constante durante todo o curso do processo, denotando que a linhagem industrial *S. cerevisiae* JP1 não foi capaz de consumir xilose, como amplamente reportado na literatura. A glicosce não foi consumida em sua totalidade, mas manteve-se em concentrações bastante reduzidas até o final do processo, denotando que este monossacarídeo foi facilmente fermentado pela levedura.

Tabela 5.10. Concentração de açúcares e etanol no início e final do processo SSF (64h) em biorreator empregando *S. cerevisiae* JP1 e celulases Multifect

Início SSF Concentração (g/L)				Final SSF Concentração (g/L)				
ART	Glicose	Celobiose	Xilose	ART	Glicose	Celobiose	Xilose	Etanol
90,5	74,5	6,3	10,4	15,2	4,4	4,9	9,8	64,4

5.5.2. Processo SSF empregando *S. cerevisiae* JP1 como inóculo e consórcio celulásico LADEBIO

O perfil cinético obtido do processo SSF utilizando celulases LADEBIO produzidas por *Penicillium funiculosum* é apresentado na Figura 5.24. Cabe ressaltar que as condições utilizadas neste processo foram as mesmas determinadas como melhores em estudos anteriores, exceto o tempo de pré-hidrólise, que foi 18 h, o

microorganismo fermentador, substituído pela levedura industrial, e o complexo celulásico, que é o foco desta etapa de estudo.

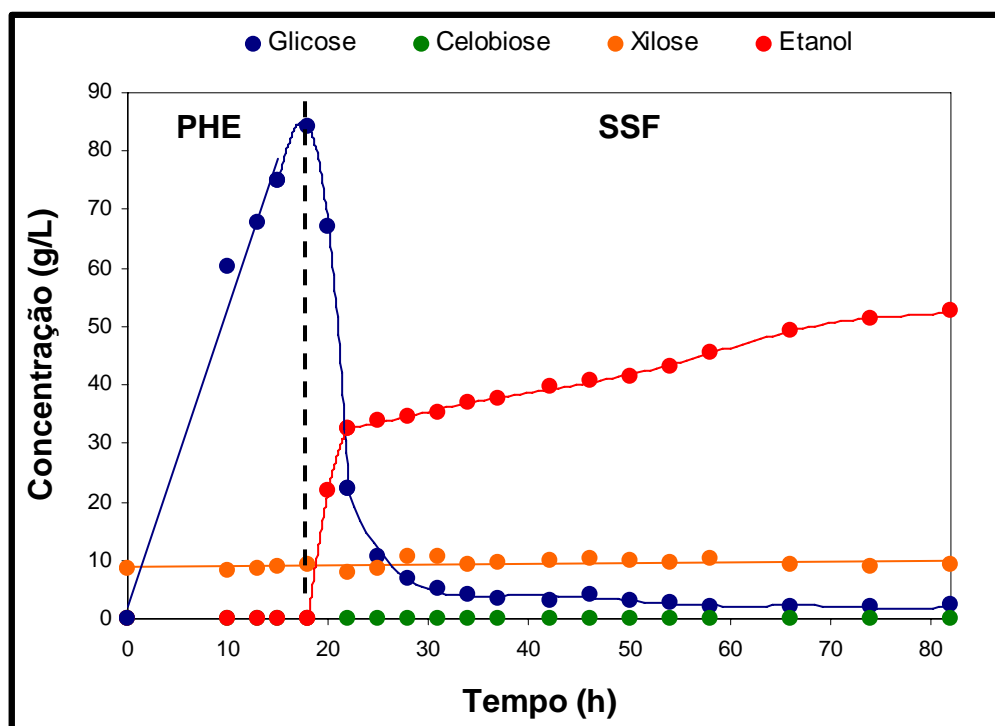


Figura 5.24. Perfil cinético do processo SSF de PM3 em biorreator empregando celulasas LADEBIO e *S. cerevisiae* JP1. Condições: relação S:L 1:4, carga enzimática de 17,5 FPU/g, 18 h de pré-HE e 8 g/L de inóculo. PHE – Pré-hidrólise enzimática

Empregando celulasas LADEBIO alcançou-se uma concentração de glicose ao final da pré-hidrólise enzimática maior (84,1 g/L) do que aquelas obtidas quando celulasas Multifect foram utilizadas (aproximadamente 73 g/L em 16 h). Ao considerar o tempo de 15 h para as celulasas LADEBIO, uma vez que a comparação anterior foi baseada em 18 h (tempo necessário para a biomassa liquefazer-se), essas enzimas conferiram concentração de glicose um pouco maior (74,8 g/L) daquela obtida com as celulasas comerciais. De acordo com o perfil cinético, se tivesse dado continuidade a pré-hidrólise enzimática nesse experimento, que ainda mostrava taxa bem acentuada, maiores concentrações de glicose certamente seriam obtidas e maior concentração de etanol poder-se-ia ser alcançada. Os resultados obtidos na hidrólise enzimática do resíduo PM3 indicaram que, assim como as celulasas comerciais, as enzimas LADEBIO foram excelentes catalisadores.

Em relação à taxa de produção de etanol, a mesma passou a ser praticamente constante com 4 h de fermentação. Neste tempo, a concentração de etanol alcançada foi de 32,5 g/L e ao final do processo (64 h) aumentou para 52,6 g/L.

Ao comparar o perfil cinético desse experimento (Figura 5.24) com o do anterior no qual se utilizou celulases Multifect (Figura 5.23), empregando a *S. cerevisiae* JP1 em ambos, verifica-se que esta levedura apresentou desempenho similar somente no início do processo, quando havia grande disponibilidade de glicose. Após a redução deste açúcar a concentrações menores que 20 g/L, a produção de etanol passou a ser dependente da atividade enzimática em ambos processos, ocorrendo maior limitação da taxa fermentativa quando utilizou-se enzimas LADEBIO. Isto pode ser explicado pela concentração de celobiose ter se mantido 0 g/L durante todo o curso do processo, indicando que o consórcio enzimático LADEBIO apresentou excelente atividade β -glucosidásica, mantendo uma concentração de glicose muito baixa no meio, que à medida que era liberada, era prontamente consumida pela grande massa celular de levedura, gerando assim uma maior limitação desse microorganismo pela reduzida concentração de glicose no meio.

Como já havia sido reportado por CASTRO *et al.* (2010), a atividade relativa de β -glucosidase no extrato bruto produzido por *P. funiculosum* (19%) é proporcionalmente maior que a de β -glucosidase das celulases Multifect (1,5%), o que implicou um acúmulo de celobiose no meio no processo em que se utilizou as enzimas comerciais.

Vale ressaltar que a iniciativa de empregar celulases produzidas *in situ* foi de extrema importância, pois o custo das celulases comerciais encarecem muito o processo global, e que estudos mais aprimorados devem ser realizados, considerando que neste experimento não se utilizou as condições otimizadas para as celulases LADEBIO.

Apesar de não terem sido empregadas na etapa de pré-hidrólise enzimática as condições otimizadas para as celulases LADEBIO, foi alcançada, no final processo SSF com PM3, concentração de etanol (52,6 g/L) maior do que aquelas relatadas por MARTIN *et al.* (2002) (12 g/L), LINDE *et al.* (2006) (25 g/L), RUIZ *et al.*

(2006) (21 g/L), KANG *et al.* (2010) (45 g/L) e ZHU *et al.* (2010) (41,8 g/L) que utilizaram celulases comerciais e cujos trabalhos foram descritos anteriormente (Tabela 2.7).

A Tabela 5.11 sumariza as concentrações de açúcares e etanol no início e final do SSF. Verifica-se que a concentração de xilose manteve-se constante durante todo o processo e que a glicose foi consumida quase em sua totalidade.

Considerando que foi alcançada maior concentração de etanol no processo em que se empregou celulases comerciais, optou-se por dar continuidade ao estudo com as celulases Multifect.

Tabela 5.11. Concentração de açúcares e etanol no início e final do processo (64h) em biorreator empregando *S. cerevisiae* JP1 e celulases LADEBIO

Início SSF Concentração (g/L)				Final SSF Concentração (g/L)				
ART	Glicose	Celobiose	Xilose	ART	Glicose	Celobiose	Xilose	Etanol
87,5	84,1	0,0	9,1	5,8	2,3	0,0	9,4	52,6

5.5.3. Processo SSF empregando *S. cerevisiae* JP1, celulases comerciais Multifect e hidrolisado suplementado com fontes de nitrogênio, fosfato e sais minerais

O perfil cinético obtido no processo SSF com hidrolisado suplementado é apresentado na Figura 5.25, mostrando comportamento muito similar ao do SSF no qual não se suplementou o hidrolisado (Figura 5.23), no que se concerne às concentrações de xilose, glicose e celobiose durante todo o curso do processo.

Nas primeiras 7 h de fermentação, alcançou-se concentração de 32 g/L, gerando uma produtividade volumétrica de 4,6 g/L.h, valor que não difere muito daqueles obtidos em fermentações convencionais de etanol a partir do caldo de cana no Brasil (5 – 8 g/L.h). Esta produtividade inicial foi bem maior do que aquela obtida por VASQUEZ *et al.* (2007), que alcançaram 30 g/L de etanol a partir de bagaço de cana em 10 h de fermentação, gerando uma produtividade volumétrica de 3,0 g/L.h.

A taxa de produção de etanol começou a reduzir a partir de 56 h de processo. Neste tempo, a concentração de etanol alcançada foi de 70,7 g/L. Ao final do processo (64 h), obteve-se 74,6 g/L de etanol, concentração 15% maior que aquela obtida no SSF com hidrolisado não suplementado (64,4 g/L). Isto indicou que a suplementação do hidrolisado de PM3 com fontes de nitrogênio, fosfato de potássio e solução de sais minerais e ácido cítrico teve influência significativa sobre a concentração final de etanol. A fim de se aumentar a concentração deste biocombustível, poder-se-ia realizar um estudo sobre a influência de cada nutriente utilizado na suplementação e, desta forma, saber quais apresentam efeito positivo e significativo sobre a variável de resposta, quais concentrações deveriam ser utilizadas e se algum nutriente tem efeito negativo, podendo assim não ser utilizado na suplementação, o que reduziria o custo total do processo.

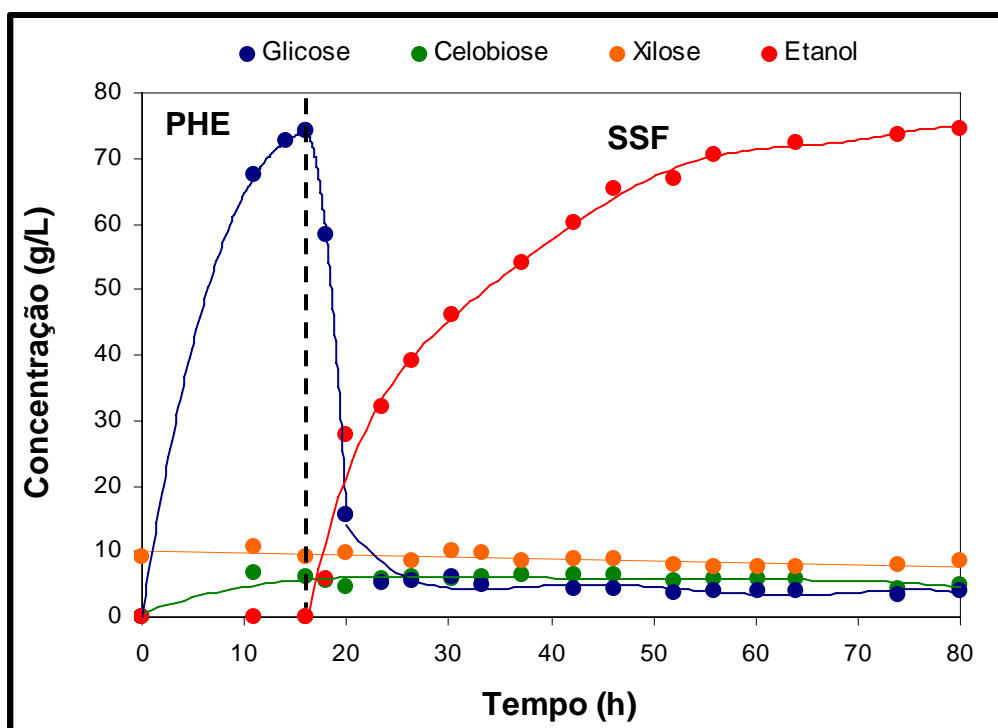


Figura 5.25. Perfil cinético do processo SSF de PM3 em biorreator com hidrolisado suplementado com fontes de nitrogênio, fosfato de potássio, solução de sais minerais e ácido cítrico. Condições: relação S:L 1:4, celulases Multifect, carga enzimática de 17,5 FPU/g e 8 g/L de *S. cerevisiae* JP1
PHE – Pré-hidrólise enzimática

A produtividade volumétrica alcançada no final do processo foi de 1,2 g/L.h, considerando tanto a etapa de pré-hidrólise enzimática (16 h) quanto a de fermentação simultânea a sacarificação (48 h). Vários trabalhos na literatura relataram produtividades muito menores daquela alcançada neste trabalho, a saber: MARTIN *et al.* (2002) alcançaram 0,25 g/L.h no processo SSF de bagaço de cana; WINGREN *et al.* (2005) obtiveram 0,35 g/L.h no SSF com madeira de *Picea abies*; BALLESTEROS *et al.* (2006) atingiram 0,01 g/L.h a partir do SSF de palha de trigo; RUIZ *et al.* (2006) alcançaram 0,29 g/L.h e 0,41 g/L.h nas fermentações de madeira de oliva e caule de girassol, respectivamente; e JORGENSEN *et al.* (2010) alcançaram 0,32 g/L.h no processo SSF de palmiste, enquanto KANG *et al.* (2010) lograram uma produtividade volumétrica de 0,3 g/L.h na fermentação da lama de cal proveniente da indústria de celulose (Tabela 2.7).

A Tabela 5.12 sintetiza as concentrações de açúcares e etanol no início e final do SSF.

Tabela 5.12. Concentração de açúcares e etanol no início e final do SSF (64h) em biorreator empregando *S. cerevisiae* JP1, celulasas Multifect e hidrolisado suplementado

Início SSF Concentração (g/L)				Final SSF Concentração (g/L)				
ART	Glicose	Celobiose	Xilose	ART	Glicose	Celobiose	Xilose	Etanol
90,5	73,9	6,1	9,3	12,3	3,9	5,0	8,6	74,6

A suplementação conferiu um aumento na concentração de etanol e, conseqüentemente, na produtividade, conforme dados relatados pela literatura, que mostraram a importância de adicionar nutrientes ao meio fermentativo (SREEKUMAR *et al.*, 1999; DANESI *et al.*, 2006).

A partir dos experimentos realizados, determinou-se as seguintes condições como as melhores para o processo SSF do resíduo PM3 para produção de bioetanol de segunda geração:

- ✓ Relação S:L 1:4;
- ✓ Carga enzimática de 17,5 FPU/g de sólido, utilizando celulasas Multifect;
- ✓ Tempo de pré-hidrólise enzimática de 16 h;

- ✓ 8,0 g/L de *S. cerevisiae* JP1;
- ✓ Suplementação do hidrolisado com fosfato de potássio, uréia, extrato de levedura e soluções de sais minerais e ácido cítrico.

Com tais condições foram possíveis alcançar os seguintes resultados: 73,9 g/L de glicose após 16 h de pré-hidrólise enzimática e 74,6 g/L de etanol após 48 h de fermentação, correspondendo a uma produtividade volumétrica nesta etapa de processo de 1,55 g/L.h.

5.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabendo-se que o rendimento teórico de etanol é 0,511 g/g, obteria-se 37,8 g/L de etanol ao considerar a concentração inicial de glicose (73,9 g/L) alcançada no final da pré-hidrólise deste experimento. Isso ocorreria se a estratégia para a produção de etanol escolhida fosse a Sacarificação e Fermentação em Separado (SHF). Entretanto, com a Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF) foi possível obter 74,6 g/L de etanol em 48 h de fermentação, quase o dobro daquela que seria obtida no SHF se a conversão da glicose a etanol fosse 100%, o que dificilmente aconteceria. O processo SSF permitiu que maiores concentrações de etanol fossem obtidas porque as celulasas não foram inibidas pelos seus produtos, que prontamente foram consumidos pelo microorganismo, permitindo que essas enzimas continuassem atuando e liberando mais glicose para ser utilizada no processo fermentativo. Assim, com a estratégia SSF, foi possível alcançar um rendimento de etanol 82% do teórico, considerando a concentração inicial de celulose.

Na Tabela 5.13 pode ser visualizada de maneira bastante sumarizada a evolução do presente trabalho, relatando as melhores condições do processo SSF que conferiram as maiores concentrações de açúcares e etanol em cada etapa do estudo.

Tendo os resultados dos ensaios de fermentabilidade para o resíduo PM3 como referência, verificou-se que por meio dos estudos da hidrólise enzimática, da otimização do processo SSF e da suplementação do hidrolisado, obtiveram-se

significativas melhorias no processo, a saber: redução da carga enzimática em 45%, reduzindo apenas 11% a concentração de glicose; e aumento da produtividade volumétrica em 46%, reduzindo, portanto, o tempo de processo SSF em 48 h e obtendo-se uma concentração de etanol 5% maior (74,6 g/L).

Tabela 5.13. Condições utilizadas e resultados obtidos em cada etapa da pesquisa

Etapa	S:L (g/mL)	CE (FPU/g)	Tempo PHE (h)	Glicose (g/L)	Inóculo (g/L)	Etanol (g/L)	Tempo SSF (h)	Qp (g/L.h)
Teste fermentabilidade	1:4	32	12	83,4	2,0	71,1	96	0,74
HE	1:4	17,5	28	76,9	-	-	-	-
I SSF	1:4	17,5	16	69,7	4,6	77,6	48	1,62
II SSF	1:4	17,5	16	73,6	8,0	66,6	36	1,85
Validação	1:4	17,5	16	73,7	8,0	65,0	36	1,81
SSF biorreator JP1 e Multifect	1:4	17,5	16	74,5	8,0	64,4	48	1,34
SSF biorreator JP1 e LABEDIO	1:4	17,5	18	84,1	8,0	52,6	48	1,1
SSF biorreator JP1, Multifect e suplementação	1:4	17,5	16	73,9	8,0	74,6	48	1,6

CE – carga enzimática; S:L – relação sólido:líquido; PHE – pré-hidrólise enzimática; HE – DCCR para hidrólise enzimática; I SSF – DCCR para SSF; II SSF – Planejamento univariável para SSF; SSF biorreator JP1 e Multifect – SSF em biorreator empregando *S. cerevisiae* JP1 e celulases Multifect; SSF biorreator JP1 e LADEBIO – SSF em biorreator empregando *S. cerevisiae* JP1 e celulases LADEBIO; SSF biorreator JP1, Multifect e suplementação – SSF em biorreator empregando *S. cerevisiae* JP1, celulases Multifect e hidrolisado suplementado com fontes de nitrogênio e fosfato e solução de sais minerais e ácido cítrico.

Uma das grandes vantagens de se produzir bioetanol a partir do resíduo proveniente do sistema de decantação da indústria de celulose, codificado neste trabalho como PM3, é a não necessidade das etapas de pré-tratamento, diferentemente do que ocorre com outros resíduos celulósicos, como bagaço de cana-de-açúcar (COZENS & MILLER, 1997; MARTIN *et al.*, 2002; BETANCUR, 2005; VÁQUEZ *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2010), cavacos residuais, palha de cana-de-açúcar, trigo e arroz (DELGENES *et al.*, 1990; NIGAN, 2001; BALLESTEROS *et al.*, 2006; RUIZ *et al.*, 2006).

A produção de etanol sem pré-tratamentos pode reduzir muito o custo total do processo, não somente em escala laboratorial, mas principalmente em escala industrial (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008). Desta forma, a não necessidade de pré-tratamentos e a alta concentração de etanol alcançada no processo SSF com PM3, mostrou que este resíduo celulósico é uma excelente e competitiva matéria-prima para a produção de bioetanol de segunda geração, gerando oportunidade para o setor de celulose aumentar o seu portfólio de produtos, dentro do contexto que vem sendo denominado de biorrefinaria.

Mesmo que o resíduo PM3 não seja gerado com a mesma magnitude que outros resíduos, como o bagaço de cana-de-açúcar (145 milhões toneladas/ano), principal foco das pesquisas que visam o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de bioetanol, é importante destacar a necessidade de translocar qualquer biomassa residual de sua posição de resíduo para a de matéria-prima, visando não somente a redução dos impactos ambientais causados pelas fontes fósseis, mas também reverter a dependência de petróleo e atingir um crescimento sustentável baseado em fontes renováveis que propiciaria o crescimento econômico, político e social de todas as nações.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste capítulo são apresentadas as conclusões inferidas com base nos resultados obtidos e análises dos dados realizadas.

6.1. CONCLUSÕES

- ✓ Considerando que os resultados obtidos no teste de fermentabilidade para PM1, PM2 e PM3 não constituíram estudos de otimização, pode-se concluir que as concentrações de etanol foram muito significativas, 70, 3 g/L, 78,8 g/L e 71,1 g/L, respectivamente, e sinalizaram desdobramentos importantes nas etapas posteriores do trabalho;
- ✓ No planejamento experimental (DCCR) para a hidrólise enzimática de PM1, PM2 e PM3, concluiu-se que ambas as biomassas apresentaram grande potencial como fonte de glicose e que as variáveis relação S:L e carga enzimática apresentaram efeitos significativos sobre a variável de resposta, concentração final glicose;

- ✓ Baseando-se nos resultados do DCCR para a hidrólise enzimática, determinaram-se as melhores condições para serem utilizadas na etapa de pré-hidrólise enzimática do processo SSF com PM3: relação S:L 1:4 e carga enzimática de 17,5 FPU/g de sólido, as quais permitiram a obtenção de 77 g/L de glicose;
- ✓ Foi possível concluir com o DCCR realizado para o SSF, que somente a concentração celular teve efeito significativo sobre a concentração de etanol, dentro da faixa analisada, não ocorrendo o mesmo para o tempo de pré-hidrólise enzimática. As melhores condições do processo foram 4,6 g/L de células e 16 h de pré-hidrólise, alcançando 77,6 g/L de etanol em 48 h.
- ✓ Ficou evidente que o processo SSF foi otimizado após o planejamento univariável, o qual mostrou que a concentração máxima de etanol foi obtida no experimento cuja concentração celular foi 8,0 g/L. A máxima concentração de etanol e produtividade volumétrica obtidas na fermentação foram 66,6 g/L e 1,85 g/L.h em 36 h, respectivamente;
- ✓ Baseando-se em todos os experimentos realizados, concluiu-se que as melhores condições para o processo SSF de PM3 conduzido em frascos agitados foram: relação S:L 1:4; carga enzimática de 17,5 FPU/g, utilizando celulasas Multifect; tempo de pré-hidrólise enzimática de 16 h; e 8,0 g/L de *S. cerevisiae* de panificação.
- ✓ Com a validação das melhores condições do processo SSF, corroborou-se a reprodutibilidade do processo em frascos agitados;
- ✓ A estratégia de crescimento do pré-inóculo em frascos agitados e do inóculo de *S. cerevisiae* JP1 em biorreator mostraram-se extremamente eficazes no que concerne na obtenção de alta concentração celular em um curto período de tempo;
- ✓ Os processos SSF conduzidos em biorreatores indicaram que a maior concentração de etanol (74,6 g/L) e produtividade (1,6 g/L.h em 48 h de fermentação) foram obtidas quando empregou-se: *S. cerevisiae* JP1, que fermentou facilmente o substrato; celulasas Multifect; e hidrolisado

suplementado com fontes de fosfato e nitrogênio e soluções de sais minerais e ácido cítrico. Podendo-se produzir 373 litros de bioetanol para cada tonelada de resíduo PM3 processada;

- ✓ Tendo o teste de fermentabilidade realizado com o resíduo PM3 como referência, o presente trabalho permitiu reduzir a carga enzimática em 45 % e aumentar a produtividade volumétrica de etanol em 46%;
- ✓ Por conseguinte, conclui-se que o resíduo celulósico do sistema de decantação da indústria de celulose (PM3) constituiu uma excelente matéria-prima para a produção de bioetanol de segunda geração empregando o processo de Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF).

6.2. SUGESTÕES

A fim de se dar continuidade à linha de pesquisa realizada nesta dissertação, são feitas as seguintes sugestões:

- ✓ Desenvolver metodologias que permitam caracterizar rapidamente as frações dos compostos lignocelulósicos do resíduo PM3;
- ✓ Otimizar o meio de cultura para o crescimento do pré-inóculo e inóculo de *S. cerevisiae* JP1;
- ✓ Otimizar a hidrólise enzimática de PM3 empregando celulasas LADEBIO a fim de se determinar as melhores condições que confirmam a máxima concentração de glicose e melhorar o desempenho desse consórcio enzimático no processo SSF;
- ✓ Otimizar as concentrações das fontes de fosfato e nitrogênio, de sais minerais e ácido cítrico, com o propósito de determinar quais variáveis apresentam efeito positivo significativo sobre a concentração de etanol e com isso aumentar a produtividade e reduzir o custo total do processo;

CAPÍTULO 7

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, R.; ASSUNÇÃO, J.V.; HIRAI, E.Y. (2005). Caracterização das emissões de aldeídos de veículos do ciclo diesel. *Revista de Saúde pública*. São Paulo, v. 39, n. 3, junho de 2005.

ALVES, D.M.G. (1994). Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP.

ANFAVEA – Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores. (2008). Anuário estatístico da indústria automobilística brasileira. Disponível em www.anfavea.com.br. Acesso em setembro de 2009.

ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2009). Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis. Disponível em www.anp.gov.br. Acesso em março de 2010.

ARACRUZ. (2009). Produção de celulose. Disponível em www.aracruz.com.br. Acesso em março de 2009.

ARANHA, D.A.D. (2002). Efeitos do alumínio sobre a fermentação alcoólica. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), USP.

- ARANTES, V. & SADDLER, J.N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, v. 3, n. 4. Disponível em www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/4. Acesso em fevereiro de 2010.
- BALESTEROS, I.; NEGRO, M.J.; OLIVA, J.M.; CABAÑAS, A.; MANZANARES, P.; BALLESTORES, M. (2006). Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 129-132, p.496-508.
- BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBURN, D.; MAXIMENKO, V.; BURA, R.; MARCOV, A.; SKOMAROVSKY, A.; OKUNEY, O.; SOLOVIERA, I.; SADDLER, J.N. (2006). Evaluation of cellulase preparation for hydrolysis of hardwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 129-132, p. 528-545.
- BETANCUR, G.J.V. (2005). Avanços em biotecnologia de hemicelulose para produção de etanol por *Pichia stipitis*. Dissertação de Mestrado. Escola de Química, UFRJ.
- BINKLEY, D.; SENOCK, R.; BIRD, S.; COLE, T.G. (2003). Twenty years of stand development in pure and mixed stands of *Eucalyptus saligna* and nitrogen-fixing *Facaltaria moluccana*. *Forest Ecology and Management*, v. 12. p. 93-102.
- BNDS – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. (2008). Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro, 316p.
- BRACELPA – Associação Brasileira de Celulose e Papel. (2010). Setor de celulose e papel. Disponível em www.bracelpa.org.br. Acesso em fevereiro de 2010.
- CAMPOS, E.S. (1997). Análise comparativa de pastas celulósicas branqueadas de eucaliptos para a fabricação de papéis de impressão e escrita. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria.
- CANETTIERI, E.V.; SILVA, J.B.A.E.; FELIPE, M.G.A. (2001). Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.90, p.159-168.
- CARPITA, N.G. & GILBEAULT, D.M. (1993). Structural models os primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Physiology*, v. 3, p. 1-3.
- CASTRO, A.M.; CARVALHO, M.LA.; LEITE, S.G.F.; PEREIRA Jr., N. (2010). Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 37, p. 151-158.
- CHERUBIN, R.A. (2003). Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), USP.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. (2009). Resolução Nº 415 de 24 de Setembro de 2009. Disponível em <http://www.cntdespoluir.org.br>. Acesso em de fevereiro de 2010.

COZENS, J.C. & MILLER, J.R. (1997). Acid hydrolysis of bagasse for ethanol production. *Renewable Energy*, v. 2-3, n. 10, p. 285-290.

D'ALMEIDA, M.L.O. (1988). Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: *Celulose e Papel, Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica*, Brasil, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. - IPT-, 2º Edição, v. 1, Capítulo III, p. 45-106.

DANESI, E.D.G.; MIGUEL, A.S.M.; RANGEL-YAGUI, C.O.; CARVALHO, J.C.M.; PESSOA Jr., A. (2006). Effect of C:N ratio and substrate source on glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) producton by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Engineering*, v. 75, p. 96-103.

DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. (1990). Acid hydrolysis of wheat straw and process consideration for ethanol fermentation by *Pichia stipitis* Y7124. *Process Biochemistry International*, August, p.132-135.

DEN HAAN, R.; ROSE, S.H.; LYND, L.R.; VAN ZYL, W.H. (2007). Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, v. 9, n.1, p. 87-94.

DUFF & MURRAY, W.D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulotics to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, v. 55, p. 1–33.

DU PEREZ, J.C.; KOCK, J.L.F.; MONTEIRO, A.M.T.; PRIOR, B.A. (1985). The vitamin requirments of *Candida shehatae* for xylose fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, v. 28, n. 3, p. 271-275.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2007). Sistema de produção de eucalipto. Disponível em www.embrapa.br. Acesso em junho de 2009.

FERRER, A.; BYERS, F.M; SULABARAN-DE-FERRER, B.; DALE, B.E.; AIELLO, C. (2002). Optimizing ammonia precessing conditions to enhance susceptibility of legumes to fiber hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98-100, p.123-133.

FOLHA ONLINE. (2009). Ciência: 2009 começou no frio e termina numa fria. Disponível em www.folha.com.br. Acesso em janeiro de 2010.

FORRESTER, D.I.; BAUHUS, J.; COWIE, A.L.; VANKLAY, J.K. (2006). Mixed-species plantations of *Eucalyptus* with nitrogen-fixing trees: A review. *Forest Ecology and Management*, v. 233 p. 211-230.

FUJITA, Y.; ITO, J.; UEDA, M.; FUKUDA, H.; KONDO, A. (2004). Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 2, p. 1207-1212.

- GHOSE, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 257-268.
- GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; GUARDABASSI, P. (2008). The sustainability of ethanol production from sugarcane. *Energy Policy*, v. 36, p 2086-2097.
- GOLDEMBERG, J. & MACEDO, I. C. (1994). The brazilian alcohol program – An overview”. *Energy for Sustainable Development*, v. 1, n.1, p. 17-22.
- GUTIERREZ, L.E. ; AMORIM, H.V. ; BASSO, L.C. (1991). Inibidores da fermentação alcoólica. *STAB, Açúcar, álcool e subprodutos*. Piracicaba, v. 9, n. 6, p.24-30.
- HAMELINCK, C.N.; HOOIJDONK, G.V.; FAAIJ, A.P.C. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, v. 28, p. 384–410.
- JORGENSEN, H; SANADI, A.R.; FELBY, C.; LANGE, N.E.K; FISCHER, M.; ERNST, S. (2010). Production of ethanol and feed by high dry matter hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, p. 318-332.
- JOSEPH JR., H. (2005). Ethanol fuel: vehicular application technology. São Paulo: Anfavea, Energy and Environment Division.
- KHANG, L.; WANG, W.; LEE, Y. (2010). Bioconversion of kraft paper mill sludges to ethanol by SSF and SSCF. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, p. 53-66.
- KOOTSTRA, A.M.J.; BEEFTINK, H.H.; SCOTT. E.L.; SANDERS, J.P.M. (2009). Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for Biofuels*, v. 2, n. 31. Disponível em www.biotechnologyforbiofuels.com/content/2/1. Acesso em janeiro de 2010.
- LAWFORD, H.G. & ROUSSEAU, J.D. (1998). Improving fermentation performance of recombinant *Zymomonas* in acetic acid-containing media. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 70-72, n. 1, p. 161-172.
- LEE, J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, v. 56, p. 1-24.
- LEE, W.G. & HUANG, C.-T. (2000). Modeling of ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* ATTC 10988 grown on the media containing glucose and fructose. *Biochemical Engineering Journal*, v. 4, n. 3, p. 217-227.
- LEMOS, J.L.S. (2001). Estudo da produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- LIMA, U.A.; AQUARONE. E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. (2001). *Biotecnologia industrial – processos fermentativos e enzimáticos*. 1ª ed. Editora Edgar Blücher, São Paulo, v. 3, 593 p.

LINDE, M.; GALBE, M.; ZACCHI, G. (2006). Simultaneous Saccharification and Fermentation of steam-pretreated barley straw. Lund University. 28th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Nashville, Tennessee.

LOPES, C.R.A. (1998). *Álise da indústria de papel e celulose no Brasil*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pós-graduação e Pesquisa em Administração, UFRJ.

LOUETTE, A. (2007). *Gestão do conhecimento: compêndio para a sustentabilidade: ferramentas de gestão de responsabilidade socioambiental*. 1ª ed. Ed. Antakarana Cultura, Arte e Ciência, São Paulo. Disponível em www.compendiosustentabilidade.com.br. Acesso em fevereiro de 2010.

LU, Y.; YANG, B.; GREGG, D.; SADDLER, J.N.; MANSFIELD, S.D. (2002). Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98-100, p. 641-653

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.V.; PRETORIUS, I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66. n. 3, p. 506-577

LYND, L.R.; ZYL, W.H.V.; McBRIDE, J.E.; LASER, M. (2005). Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16. n. 5, p. 577-583.

MACEDO, I.C.; SEABRA, J.E.A.; SILVA, J.E.A.R, S. (2008). Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020". *Biomass and Bioenergy*, v. 32, p. 582-595.

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2010). Secretaria de Produção e Agroenergia. Departamento da cana-de-açúcar e Agroenergia. *Produção brasileira de etanol*. Disponível em www.agricultura.gov.br. Acesso em fevereiro de 2010.

MARTIN, C.; GALBE, M.; NILVEBRANT, N.; JÖNSSON, L.J. (2002). Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98-100, p. 699-715.

McCANN, M.C. & ROBERTS, K. (1991). Architecture of the primary cell wall. In: LOYD, C.W., (ed.). *The Cytoskeleton / Basis of plant Growth and Form*. London: Academic Press, p. 109-129.

McMILLAN, J.D.; NEWMAN, M.M.; TEMPLETON, D.W.; MOHAGHEGHI, A. (1999). Simultaneous Saccharification and Cofermentation of dilute-acid pretreated yellow poplar hardwood to ethanol using xylose-fermenting *Zymomonas mobilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77-79, p. 649-665.

MENEZES, T.J.B. & AGUIAR, L.C. (2002). conversão enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. *Biociência*, n. 16, maio-junho.

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

MONTGOMERY, D. & CALADO, V. (2003). Planejamento de experimentos usando o Statistic. Editorial E-papers Serviços editoriais, Rio de Janeiro, Brasil.

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

MUSSATO, I.S.; ROBERTO, I.C. (2002). Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, n.28, p.34-39, set/out 2002.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. (2002). Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98, p. 49-58.

NIGAM, J.N. (2001). Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 26, p. 145-150.

ODAC – The Oil Depletion Analysis Centre. (2007). Disponível em www.odac-info.org. Acesso em fevereiro de 2007.

ÖHGREN, K.; BENGTSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; GALBE, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; ZACCHI, G. (2006). Simultaneous Saccharification and Co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology*, v. 126, n. 4, p. 488-498.

OLSSON, L.; SOERENDEN, H.R.; DAM, B.P.; CHRISTENSEN, H.; KROGH, K.M.; MEYER, A.S. (2006). Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 129-132, p. 117-129.

PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D.J. & SADDLER, N.J. (2005). Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121-124, p. 1069-1079.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. *Biosource Technology*, v. 74, p. 69-80.

PEDRAZZI, C. (2005). Qualidade de chapas de partículas de madeira aglomerada fabricadas com resíduos de uma indústria de celulose. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, UFSM.

PEREIRA Jr., N. (1991). Investigation of D-xylose fermenting yeast. Ph.D. Thesis. Department of Chemistry. The University of Manchester, U.K.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. (2008). Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In Series on Biotechnology, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 45 p.

PEREIRA, R.E (2006). Avaliação do potencial nacional de geração de resíduos agrícolas para a produção de etanol. Dissertação de Mestrado Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Brasil.

PERVAIZ, M. & CORREA, C.A. (2009). Biorrefinaria - Desenvolvimento de plataformas químicas através de tecnologias integradas de biomassa. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 19, n. 1, PP E9-E11.

PHILIPPIDIS, G.P. & SMITH, T.K. (1995). Limiting factors in the Simultaneous Saccharification and Fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 51/52, p. 117-124.

RFA – Renewable Fuels Association. (2010). 2008 World fuel ethanol production. Disponível em <http://www.ethanolrfa.org>. Acesso em Fevereiro de 2010.

ROSA, C.A.B. (2003). Influência no teor de lignina da madeira de *Eucalyptus globulus* na produção e na qualidade da celulose kraft. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM.

RUIZ, E.; CARA, C.; BALLESTEROS, M.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I.; CASTRO, E. (2006). Ethanol production from pretreated olive tree wood and sunflower stalks by an SSF process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 129-132, p. 631-643.

SÁNCHEZ, O.J. & CARDONA, C.A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 5270-5295.

SANTOS, A.S.; VALLE, M.L.M.; GIANNINI, R.G. (2000). A experiência brasileira no desenvolvimento de um combustível binário ácool-diesel. *Economia e Energia*, n. 20. Disponível em <http://www.ecen.com/eee20/adailson>. Acesso em fevereiro de 2010.

SANTOS, D.S.; CAMELO, A.C.; RODRIGUES, K.C.; CARLOS, L.C.; PEREIRA Jr., N. (2010). Ethanol production from sugarcane bagasse by *Zymomonas mobilis* using Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, p. 93-105.

SEWALT, V.J.H.; BEAUCHEMIN K.A.; RODE L.M.; ACHARYA, S.; BARON, V.S. (1997). Lignin impact on fiber degradation. iv. enzymatic saccharification and in vitro digestibility of alfalfa and grasses following selective solvent deslignification. *Bioresource Technology*, v. 61, p.199-206.

SREEKUMAR, O.; CHAND, N., BASAPPA, S. (1999). Optimization and interaction of media components in ethanol production using *Zymomonas mobilis* by response surface methodology. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 88, n. 3, p. 334-338.

STAPE, J.L.; BINKLEY, D.; RYAN, M.G.; FONSECA, S.; LOOS, R.A.; TAKAHASHI, E.N. (2010). The Brazil *Eucalyptus* potential productivity project: Influence of water, nutrients and stand uniformity on wood production. *Forest Ecology and Management*, v. 259, n. 9, p. 1684-1694.

STENBERG, K.; BOLLÓK, M.; RÉCZEY, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G. (1999). Effect of substrate and cellulase concentration on SSF of steam-pretreated softwood for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 68, n. 2, p. 204-210.

SUN, Y. & CHENG, J.J. (2005). Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1599-1606.

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

SZWARC, A. (2010). Etanol - Carros flex: uso de etanol já evitou emissão de mais de 83 milhões de toneladas de CO₂. UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Disponível em <http://www.unica.com.br/noticias>. Acesso em fevereiro de 2010.

TAHERZADEH, M.J. & KARIMI, K. (2007). Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources*, v. 2, n. 4, p. 707-738.

TAMANINI, C. & HAULY, M.C.O. (2004). Resíduos agroindustriais para a produção biotecnológica de xilitol. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 25, n. 4, p. 315-330.

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

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. (2005). *Microbiologia*. 8 ed. Ed. Artmed, Porto Alegre, 894 p.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. (2009). Produção de etanol, açúcar e cana-de-açúcar no Brasil. Disponível em www.unica.com.br. Acesso em fevereiro de 2010.

VARGA, E.; SZENGYEL Z.; RÉCZEY, K. (2002). Chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98-100, p. 73-87.

VÁSQUEZ, M.P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA Jr., M.B.; PEREIRA Jr., N. (2007). Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 137-140, issues 12.

VERENIUM – The nature of energy. (2008). Energy independence and security act of 2007 (EISA). Disponível em www.verenium.com. Acesso em dezembro de 2008.

VLASENKO, E.Y.; DING, H., LABAVITCH, J.M.; SHOEMAKER, S.P. (1997). Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. *Bioresource Technology*, v. 59, p. 109-119.

WINGREN, A.; GALBE, M.; ROSLANDER, C.; RUDOLF, A.; ZACCHI, G. (2005). Effect of reduction in yeast and enzyme concentrations in a SSF based bioethanol process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121-124, p. 485-499.

WU, A. & LEE, Y.Y. (1997). Inhibition of the enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol. *Biotechnology Letters*, v. 19, p. 977-979.

XU, J.; THOMSEN, M.H.; THOMSEN, A.B. (2009). Feasibility of hydrothermal pretreatment on maize silage for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, in press.

ZHANG, J. & SMITH, K.R. (2007). Household air pollution from coal and biomass fuels in China: Measurements, health impacts, and interventions. *Environ Health Perspect*, v. 115, n. 6, p. 848–855.

ZHANG, M.; SHUKLA, P.; AYYACHAMY, M; PERMAUL, K; SINGH, S. (2009). Improved bioethanol production through Simultaneous Saccharification and Fermentation of lignocellulosic agricultural wastes by *Kluyveromyces marxianus* 6556. *Applied Microbiology and Biotechnology*, in press.

ZHANG, Y.H.P. & LYND, L.R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 88, n. 7, p. 797-824.

ZHU, J.Y; ZHU, W.; BRYAN, O.P.; DIEN, B.S; TIAN, S.; GLEISNER, R.; PAN, X.J. (2010). Ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine: preliminary evaluation of mass balance and process energy efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, in press.