



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

CHANEL MOACYR DE CARLI

**HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM
ESCALA DE BANCADA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G**

São Carlos - SP - 2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

CHANEL MOACYR DE CARLI

**HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM
ESCALA DE BANCADA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial para obtenção do Grau de mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento em Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz
Co-Orientador: Profa. Dra. Rosineide Gomes da Silva

São Carlos - SP - 2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C286hf

Carly, Chanel Moacyr de.

Hidrólise e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar em escala de bancada para produção de etanol 2G / Chanel Moacyr de Carly. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
81 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Alcool. 2. Hidrólise enzimática. 3. Fermentação alcoólica. 4. Glicose. I. Título.

CDD: 661.82 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
CHANEL MOACYR DE CARLI APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS, EM 26 DE AGOSTO DE 2011.

BANCA EXAMINADORA:



Antonio José Gonçalves Cruz
Orientador, UFSCar



Rosineide Gomes da Silva Cruz
Co-orientadora, UFSCar



Cristiane Sanchez Farinas
Embrapa/São Carlos



Roberto de Campos Giordano
UFSCar

*Dedico esta dissertação aos meus pais
Clenira e Moacyr (in memoriam) e a minha
família pelo incentivo e apoio durante esta
minha caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Antonio José Gonçalves da Cruz pela orientação, apoio e confiança no meu trabalho. Agradeço pelos ensinamentos e palavras sábias que contribuíram para meu crescimento profissional e, sobretudo pessoal.

À professora Rosineide Gomes da Silva pela co-orientação e contribuição para o desenvolvimento desse trabalho, minha sincera gratidão e consideração.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química que fazem parte do Projeto Temático FAPESP-BIOEN, principalmente à professora Raquel e ao professor Roberto pelas valiosas discussões.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e ao Departamento de Engenharia Química (UFSCar) por tornarem possível a realização deste trabalho.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC, Piracicaba) pelo fornecimento do material de estudo: bagaço de cana-de-açúcar.

À Empresa Genencor pelo fornecimento do extrato enzimático utilizado neste trabalho.

À USP de São Carlos e ao Departamento de Engenharia de materiais pela ajuda na caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar e análises de MEV.

Aos técnicos do Departamento de Engenharia Química da UFSCar pela amizade e importante auxílio durante a realização deste trabalho.

À todos amigos do DEQ-UFSCar pelos momentos compartilhados.

Em especial aos meus pais Clenira e Moacyr (*in memoriam*) e toda minha família por sempre apoiar em minhas decisões e torcerem pela concretização de mais uma etapa de minha vida.

À todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e estiveram presentes de alguma forma nesta minha caminhada.

Muito obrigado.

*“Sonho que se sonha só,
É só um sonho que se sonha só.
Mas sonho que se sonha junto,
É realidade.”*

(Raul Seixas)

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Quadros	vi
Lista de Tabelas	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Bagaço de cana-de-açúcar: um material promissor	5
2.2. Estrutura do bagaço de cana-de-açúcar	7
2.3. Produção de etanol de segunda geração	10
2.3.1. Etapa de pré-tratamento	10
2.3.1.1. Pré-tratamentos de descompressão rápida	12
2.3.1.1.1. Pré-tratamento de explosão a vapor	12
2.3.1.1.2. Pré-tratamento AFEX	12
2.3.1.2. Pré-tratamento ácido	12
2.3.1.3. Pré-tratamento alcalino	13
2.3.1.3.1. Pré-tratamento com NaOH	13
2.3.1.3.2. Pré-tratamento com NH ₄ OH	14
2.3.1.4. Pré-tratamento biológico	15
2.3.1.5. Pré-tratamentos físicos	15
2.3.1.5.1. Cominuição	15
2.3.1.6. Pré-tratamento com solventes	16
2.3.1.6.1. Solventes orgânicos	16
2.3.2. Hidrólise	18
2.3.2.1. Hidrólise e fermentação separadas (SHF)	21
2.3.2.2. Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)	22
2.3.3. Fermentação de hidrolisados em materiais lignocelulósicos	23
2.4. Dados do setor	25
2.4.1. Dados históricos	25
2.4.2. Dados econômicos	27
2.4.3. Dados ambientais	31

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. Materiais.....	33
3.2. Métodos.....	33
3.2.1. Pré-tratamento do bagaço <i>in natura</i> e explodido.....	33
3.2.2. Pré-tratamento do bagaço <i>in natura</i> e explodido com solução de hidróxido de amônio.	34
3.2.3. Determinação da umidade das amostras de bagaço	35
3.2.4. Determinação do rendimento na etapa de pré-tratamento	35
3.2.5. Caracterização das amostras de bagaço de cana-de-açúcar	36
3.2.5.1. Hidrólise com ácido sulfúrico 72%.....	36
3.2.5.2. Determinação de lignina insolúvel na fração sólida.....	37
3.2.5.3. Determinação de lignina solúvel na fração líquida	37
3.2.5.4. Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e Hidroximetilfurfural na fração líquida	38
3.2.5.5. Determinação de cinzas	38
3.2.6. Determinação de glicose	39
3.2.7. Determinação de etanol e glicose	39
3.3. Caracterização do bagaço (MEV)	40
3.4. Hidrólise enzimática das amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas	40
3.5. Determinação de proteína	42
3.6. Determinação de atividade enzimática.....	42
3.7. Fermentações	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
4.1. Pré-tratamento e caracterização do bagaço (Etapa 0	45
4.2. Avaliação dos efeitos de diferentes cargas de enzimas na etapa de hidrólise (Etapa 1).....	49
4.3. Avaliação da influência de diferentes pré-tratamentos no processo de hidrólise (Etapa 2).....	51
4.4. Testes nas configurações SHF (<i>Separated hydrolysis and fermentation</i>), SSF (<i>Simultaneous saccharification and fermentation</i>) e Batelada alimentada (Etapa 3).	54
4.5. Aumento de escala e de carga de sólidos nos experimentos de hidrólise enzimática (Etapa 4)	64
5. CONCLUSÕES	73
6. SUGESTÃO PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO	75
7. REFERÊNCIAS.....	76

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as etapas de hidrólise enzimática e fermentação do caldo hidrolítico do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) para produção de etanol de segunda geração (2G). Foram realizados experimentos de hidrólise enzimática empregando cargas de sólidos de 8%, 10%, 15% e 20% (m/v). Amostras de BCA *in-natura* e explodido a vapor foram submetidas a diferentes seqüências de pré-tratamentos: água + solução de NaOH 4%; solução de H₂SO₄ 1% + solução de NaOH 4%; solução de H₂SO₄ 1% + solução de NaOH 7%; solução NaOH 7%; amônia aquosa 15%; água. As amostras de bagaço foram caracterizadas química e estruturalmente (MEV). Os rendimentos em cada seqüência de pré-tratamento foram calculados. O material pré-tratado foi submetido a experimento de hidrólise enzimática com diferentes cargas de enzimas (33, 65 e 98 FPU/g de celulose) e configurações (SHF – *Separated Hydrolysis and Fermentation*, SSF – *Simultaneous Saccharification and Fermentation*, e BA – *Batelada Alimentada*). Nestes experimentos foi utilizado extrato enzimático Accelerase 1500 (Genencor). Na etapa de pré-tratamento a amostra de BCA *in natura* pré-tratada com água e solução de NaOH 4% obteve a menor perda de celulose (23,9%). A remoção de hemicelulose e lignina foi de 73,7% e 79,1%, respectivamente. As demais seqüências de pré-tratamento obtiveram valores de remoção de hemicelulose entre 72,3% a 92,2% e de remoção de lignina entre 60,0% a 88,9%. Hidrólises realizadas com alta carga de sólido (20%) apresentaram um hidrolisado mais concentrado em glicose (ca. 110 g/l), obtendo-se 64% de conversão em 34 horas. Após a etapa de hidrólise seguiu-se a etapa fermentação. Esses experimentos foram realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (liofilizado comercial) obtendo-se rendimentos na faixa de 75 a 94%. Experimento realizado na configuração SSF atingiu 86,5% de conversão de celulose a etanol em 14 horas de experimento. Experimento na configuração SHF obteve 63,2% de conversão de celulose a etanol em 37 horas. Experimento em BA obteve maior massa de glicose com a mesma quantidade de enzima utilizada no experimento em batelada e no mesmo tempo.

Palavras-chaves: Etanol, sacarificação, hidrólise enzimática, fermentação alcoólica.

HYDROLYSIS AND FERMENTATION OF SUGAR CANE BAGASSE IN BENCH SCALE FOR 2G ETHANOL PRODUCTION

The objective of this work was to evaluate the hydrolysis and alcoholic fermentation stages of the sugar cane bagasse (SCB) for second generation ethanol production (2G). Hydrolysis experiments were carried out employing 8%, 10%, 15% and 20% (m/v) solid loads. Samples of *in natura* SCB and steam exploded SCB were submitted to different pretreatment sequences: water + 4.0% NaOH solution; 1.0% H₂SO₄ solution + 4.0% NaOH 4%; 1.0% H₂SO₄ solution + 7.0% NaOH solution; 7.0% NaOH solution; aqueous ammonia; water. Pretreated bagasse was characterized (chemical analysis and SEM) and the mass yield of each sequence was evaluated. This material was employed in hydrolysis experiments using different enzyme loads (33, 65 and 98 FPU/g-cellulose). Three different configurations were evaluated: SHF – *Separated Saccharification and Fermentation*, SSF – *Simultaneous Hydrolysis and Fermentation*, and FB – *Fed-Batch*. In these experiments it was employed Accelerase 1500 enzymatic extract (Genencor). Concerning cellulose loss, SCB pretreated with water and 4.0% of NaOH solution presented the best result (23.9%). For this case, the hemicellulose and lignin removal was 73.7% and 79.1%, respectively. For the others pretreatment sequences the hemicellulose and lignin removal range from 72.3 to 92.2%. For lignin removal the values range from 60.0 and 88.9%. Experiments employing high solid load (20%) resulting in a more concentrated hydrolyzed (ca. 110 g/L). In this experiment it was achieved 64% of cellulose to glucose conversion in 34 hour. The fermentation experiments were carried out employing *Saccharomyces cerevisiae* yeast (lyophilized commercial). The yield ranges from 75 to 94%. Experiment conducted in the SSF configuration achieved 86.5% of cellulose to ethanol conversion in 14 hours. Experiment carried out in SHF configuration achieved 63.2% of cellulose to ethanol conversion in 37 hours. Experiments carried out in FB configuration reached larger amount of glucose with the same enzyme load employed in batch experiment and at the same time.

Key-words: *Ethanol, saccharification, enzymatic hydrolysis, alcoholic fermentation.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estimativa do excedente de bagaço de cana considerando que 90% deste material é queimado nas caldeiras.....	6
Figura 2- Estimativa de produção de etanol empregando bagaço de cana-de-açúcar em dois cenários.	6
Figura 3 - Estrutura dos materiais lignocelulósicos.	7
Figura 4 - Estrutura da celulose.	8
Figura 5 - Representação da cadeia linear da celulose.	8
Figura 6 - Estrutura da hemicelulose.....	8
Figura 7 - Estrutura da lignina.	9
Figura 8 - Representação esquemática da hidrólise de celulose para glicose por ação de celulases.....	20
Figura 9 - Comparação entre hidrólise SHF e SSF.....	23
Figura 10 - Fluxograma proposto por OLSSON, 1996 para produção de etanol celulósico.....	25
Figura 11 – Matriz energética brasileira	26
Figura 12 - Produção de etanol no Brasil	28
Figura 13 – Evolução do preço do barril de petróleo (em dólar/barril) ao longo dos anos.	29
Figura 14 - Preço do etanol e da gasolina no Brasil.....	30
Figura 15 - Fabricação de automóveis no Brasil	31
Figura 16 - Fotografia dos frascos Erlenmeyer e balão de vidro ao final da etapa de pré-tratamento (etapa de deslignificação) das amostras de BCA <i>in natura</i> e explodido (deslignificação com solução de NaOH).	34
Figura 17 - Fotografia do reator cilíndrico de aço inoxidável (autoclave) utilizado nos experimentos de pré-tratamento do BCA empregando solução de NH ₄ OH (Silva, 2011).	35
Figura 18 - Fotografia do reator utilizado nos experimentos de hidrólise enzimática na configuração SHF (<i>Separated Hydrolysis and Fermentation</i>) nas etapas 1, 2 e 3.	41
Figura 19 - Fotografia do reator utilizado nos experimentos de hidrólise enzimática na configuração SHF (<i>Separated Hydrolysis and Fermentation</i>) na etapa 4.	41
Figura 20 - Diagrama de blocos simplificado do procedimento experimental realizado neste trabalho para produção de etanol 2G em escala de bancada a partir do BCA.	43
Figura 21 - Diagrama de blocos apresentando as seqüência de pré-tratamentos utilizados e respectiva nomenclatura empregada.	44
Figura 22 – Fotografias e microscopia eletrônica de varredura de diferentes bagaços pré-tratados.....	46

Figura 23 - Composição percentual de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas nas amostras de BCA analisadas.	47
Figura 24 - Perda de celulose e remoção de hemicelulose e lignina para diferentes pré-tratamentos de bagaço de cana-de-açúcar.....	48
Figura 25 - Fotografia do reator utilizado nos experimentos de hidrólise enzimática da etapa 1 (volume do meio reacional 60 mL).	49
Figura 26 - Conversão enzimática da celulose em glicose em função da amostra de BCA utilizada e da carga de enzima para o tempo 10 horas.....	50
Figura 27 - Concentração de glicose em função do tempo nos experimentos de hidrólise realizados com diferentes cargas enzimáticas para as diferentes amostras de BCA pré-tratadas.....	50
Figura 28 - Fotografia dos experimentos de hidrólise enzimática empregando diferentes materiais pré-tratados.....	52
Figura 29 - Conversão de celulose a glicose nos experimentos de hidrólise enzimática.	52
Figura 30 - Conversão de celulose a glicose nos experimentos de hidrólise empregando amostras de BCA IN e EX (seco e úmido) em 8 horas de experimento.	53
Figura 31 - Concentração de glicose ao longo dos experimentos de hidrólise enzimática empregando BCA <i>in natura</i> submetidos a diferentes pré-tratamentos....	54
Figura 32 - Gráfico da conversão enzimática de celulose a glicose (em 35 horas) nos experimentos empregando carga de enzima de 65 FPU/g-celulose nas etapas 1, 2 e 3.	55
Figura 33 - Concentração de glicose e conversão ao longo do experimento de hidrólise do BCA IN: H ₂ SO ₄ 1% + NaOH 4% (etapa 3).....	56
Figura 34 - Concentração de glicose e etanol ao longo do experimento empregando hidrolisado proveniente da etapa 2.	57
Figura 35 - Concentração de glicose e etanol ao longo do experimento empregando hidrolisado proveniente da etapa 3.	58
Figura 36 - Gráfico da concentração de glicose e etanol no experimento realizado na configuração SSF (hidrólise e fermentação simultâneas).	59
Figura 37 - Concentração de glicose e etanol no experimento realizado na configuração SSF empregando amostra de BCA IN: H ₂ SO ₄ 1% + NaOH 4%.	60
Figura 38 - Concentração de glicose nos ensaios realizados em batelada e batelada alimentada durante experimentos de hidrólise enzimática.....	62
Figura 39 - Conversão em função do tempo para os experimentos em batelada e batelada alimentada.	63
Figura 40 - Massa de glicose em função do tempo em batelada e batelada alimentada.....	64
Figura 41 - Diagrama de blocos do processo de pré-tratamento do BCA e estimativa com volume de água utilizado em cada etapa.	65

Figura 42 - Concentração de glicose variando com tempo para hidrólise com diferentes cargas de sólidos.....	66
Figura 43 - Conversão da etapa de hidrólise para diferentes cargas de sólidos.....	67
Figura 44 - Comparação entre os experimentos de hidrólise enzimática realizados com carga de sólidos de 15% e 20% (BCA IN: H ₂ SO ₄ 1% + NaOH 7%)......	68
Figura 45 - Seqüência de fotografias ao longo de experimento de hidrólise enzimática (20% de carga de sólidos).....	69
Figura 46 - Concentração de glicose e etanol na fermentação do hidrolisado proveniente do BCA IN: H ₂ SO ₄ 1% + NaOH 7% (carga de sólidos empregada no experimento de hidrólise: 15%)......	70
Figura 47 - Concentração de glicose e etanol na fermentação do hidrolisado proveniente do BCA IN: H ₂ SO ₄ 1% + NaOH (carga de sólidos empregada no experimento de hidrólise: 20%).....	70
Figura 48 - Concentração de glicose e etanol na fermentação do hidrolisado proveniente do BCA EX: H ₂ O) (carga de sólidos empregada no experimento de hidrólise: 20%).....	71
Figura 49 - Concentração de glicose e etanol na fermentação do hidrolisado proveniente do BCA IN: NaOH 7% (carga de sólidos empregada no experimento de hidrólise: 20%).....	71
Figura 50 - Concentração de glicose e etanol ao longo do experimento de fermentação alcoólica da mistura hidrolisado e melão.	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Métodos de pré-tratamentos de materias lignocelulósicos para hidrólise enzimática.	17
Quadro 2 – Comparação entre hidrólise ácida e hidrólise enzimática.....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Balanço de energia na produção de etanol com diferentes materias primas	32
Tabela 2 – Composição dos três principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina) para bagaço de cana-de-açúcar após diferentes sequências de pré-tratamentos empregadas neste trabalho e rendimento de cada sequência.	45
Tabela 3 – Concentração de glicose, conversão e produtividade obtidos nos experimentos de hidrólise enzimática com diferentes pré-tratados e carga de sólidos.	67

1. INTRODUÇÃO

Bagaço é um resíduo gerado após a extração do caldo da cana-de-açúcar. Esse resíduo é uma das maiores fontes de biomassa disponível para uso industrial (PANDEY *et al.*, 2000). Dentre as diversas aplicações propostas para esta fonte de biomassa, a obtenção de açúcares (monossacarídeos) a partir do bagaço para a produção do etanol combustível tem atraído grande interesse dos pesquisadores (BOTHA *et al.*, 2006).

O uso de materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana para a produção de biocombustíveis requer, primeiramente, uma etapa de pré-tratamento para separação dos polímeros constituintes e aumento da acessibilidade à celulose, para facilitar a posterior hidrólise desta à glicose. Esta é uma das etapas mais custosas devido à utilização de reagentes de preço elevado, demanda energética e/ou geração de resíduos (NASCIMENTO, 2011).

Além da etapa de pré-tratamento existem ainda as etapas de hidrólise, fermentação do caldo hidrolítico e destilação do vinho fermentado delevedurado. Após a etapa de pré-tratamento, a fração de celulose pode ser hidrolisada em hexoses e, em seguida fermentada a etanol. A hidrólise pode ser catalisada por ácido ou enzimas celulolíticas, sendo esta última mais promissora por possuir certas vantagens em relação à hidrólise ácida (NGUYEN, 1993). O processo enzimático, realizado a pressão ambiente e temperaturas moderadas (50 - 60°C), vem sendo amplamente estudado na literatura. Neste processo não há formação de produtos indesejáveis. Contudo, este processo enfrenta alguns gargalos tecnológicos, dentre eles, o elevado custo das enzimas.

Na etapa de fermentação, a glicose presente no hidrolisado é consumida pelas leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) em etanol, dióxido de carbono e outros sub-produtos (em menor quantidade).

As etapas de hidrólise e fermentação podem ser conduzidas de forma separada, na configuração denominada SHF (*Separated Hydrolysis and Fermentation*) ou de forma simultânea, na configuração chamada de SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*).

1.1. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar as etapas de hidrólise e fermentação, testando diferentes cargas de enzimas, de sólidos, e três configurações: Hidrólise e Fermentação Separadas (SHF, *Separated Hydrolysis and Fermentation*), Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF, *Saccharification and Simultaneous Fermentation*) e a operação da etapa de hidrólise no modo batelada alimentada (BA). Para isso foi realizado diversas sequências de pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar buscando um material pré-tratado de melhor qualidade para hidrólise enzimática.

Os experimentos de hidrólise e fermentação foram realizados em volumes de 50 mL e 1.000 mL. Dessa forma foi possível avaliar alguns aspectos advindos do aumento de escala do processo.

Para alcançar esse objetivo as seguintes etapas foram realizadas:

Etapa 0:

- Pré-tratamento e a caracterização das amostras de BCA (*in natura*, explodido a vapor, antes e após cada sequência de pré-tratamento);

Etapa 1:

- Experimentos de hidrólise enzimática empregando diferentes cargas enzimáticas e amostras de BCA *in natura* pré-tratadas com as seguintes sequências: água + solução de NaOH 4% e amônia aquosa 15%;

Etapa 2:

- Experimentos de hidrólise empregando amostras de BCA *in natura* e explodido a vapor pré-tratadas com as seguintes sequências: água + solução de hidróxido de NaOH 4% e amônia aquosa 15%;

- Experimentos para avaliar a influência da umidade das amostras pré-tratadas no rendimento na etapa de hidrólise;

Etapa 3: Desempenho da hidrólise e fermentação em três diferentes configurações empregando amostras de BCA *in natura* pré-tratada com a sequência solução de H₂SO₄ 1% + solução de NaOH 4%:

- SHF (*Separated Hydrolysis and Fermentation*)
- SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) e;
- BA (*Batelada Alimentada*) na etapa de hidrólise enzimática (alimentação de material pré-tratado ao reator ao longo do tempo);

Etapa 4: Experimentos em maior escala (aumento de 1:20) empregando amostras de BCA *in natura* e explodido a vapor pré-tratadas com as seguintes sequências: solução de H₂SO₄ 1% + solução de NaOH 4%; solução de H₂SO₄ 1% + solução de NaOH 7%; solução de NaOH 7%; água + solução de NaOH 4%; água. O objetivo foi avaliar:

- Diferentes cargas de sólidos nos experimentos de hidrólise enzimática;
- Adição de melaço de cana-de-açúcar no licor gerado na etapa de hidrólise na fermentação alcoólica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A busca por novos combustíveis vem sendo amplamente estudada nos dias atuais. Apesar de o petróleo ser o principal combustível utilizado, ele traz um amplo histórico de danos ambientais, conflitos e, além disso, é também fonte não-renovável de energia. Neste contexto, dentre os mais variados tipos de fonte de energia alternativa como eólica, solar, geotérmica e maremotriz destaca-se a energia da biomassa.

A biomassa inclui restos de madeira, galhos, folhas, capim-elefante, casca de arroz como também palhas e gramíneas. Também conhecida como materiais lignocelulósicos, a biomassa mais popular no Brasil é, sem dúvida, o bagaço de cana-de-açúcar. Atualmente, o principal uso deste material, é a queima nas caldeiras para gerar vapor e energia elétrica nas usinas de cana-de-açúcar. O bagaço tem um grande potencial para a produção de etanol celulósico.

O custo da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos está se tornando cada vez mais viável com o avanço das pesquisas nesta direção, podendo-se assim aumentar a produção deste combustível sem um aumento na área de plantio.

São muitos os benefícios que o etanol celulósico e outros biocombustíveis podem proporcionar, dentre eles o Instituto de Economia Agrícola (IEA 2004) cita:

Redução na demanda de combustíveis fósseis. Biocombustíveis podem substituir os combustíveis a base de petróleo nos veículos de hoje. No Brasil o etanol é utilizado como aditivo na gasolina (20-25%). Biodiesel pode ser misturado com diesel comum em qualquer proporção para operação em motores diesel (pequenas quantidades de etanol podem também ser adicionadas ao diesel, em certas condições). No caso do Brasil há uma facilidade ainda maior devido a todo sistema já implantado de carros *flex fuel*, que podem utilizar tanto gasolina como etanol.

Reduções de gases causadores do efeito estufa. Etanol e biodiesel trazem grandes efeitos na redução de gases poluentes da camada de ozônio com relação aos combustíveis fósseis. Biocombustíveis podem beneficiar a qualidade do ar

quando usados puros ou misturados. Estes benefícios incluem menores emissões de CO, SO₂ e material particulado.

Benefícios no desempenho do veículo. Etanol possui um alto valor de octanagem e pode ser utilizado para aumentar a octanagem da gasolina melhorando assim o rendimento de motores a explosão.

Benefícios para a agricultura. Produção de etanol de milho e cana traz um produto adicional para o setor da agricultura e beneficia assim comunidades rurais.

2.1. Bagaço de cana-de-açúcar: um material promissor

Muitos materiais lignocelulósicos têm sido avaliados para produção de bioetanol (SÁNCHEZ, 2008). Em geral, os materiais lignocelulósicos para produção de bioetanol podem ser divididos em seis grupos principais: resíduos de agricultura (bagaço de cana, palha de milho, palha de trigo, palha e casca de arroz, palha de cevada, bagaço de sorgo, caroços de azeitona e celulose), madeira dura, madeira mole (coníferas), resíduos de celulose (papel de jornal, papel de escritório), biomassa herbácea (feno, gramíneas), e resíduos municipais sólidos.

Dentre todos estes materiais, no Brasil, destaca-se o bagaço de cana, gerado em grande quantidade, e atualmente usado nas usinas para a co-produção de energia através de sua queima. Segundo OLIVEIRA, 2007, estima-se que o índice de produção de bagaço pode chegar a 280 kg por tonelada de cana moída (50% de umidade). Este material apresenta um poder calorífico inferior da ordem de 7.500 kJ/kg.

Assim, um outro importante motivo para intensas buscas pela conversão de materiais lignocelulósicos para etanol além do seu potencial de conversão é a abundância deste material, com cerca de aproximadamente 32 milhões de toneladas de excedente em 2009 (dados estimados com base na cana processada e considerando a queima de 90% deste material nas caldeiras das usinas, UNICA 2010), Figura 1.

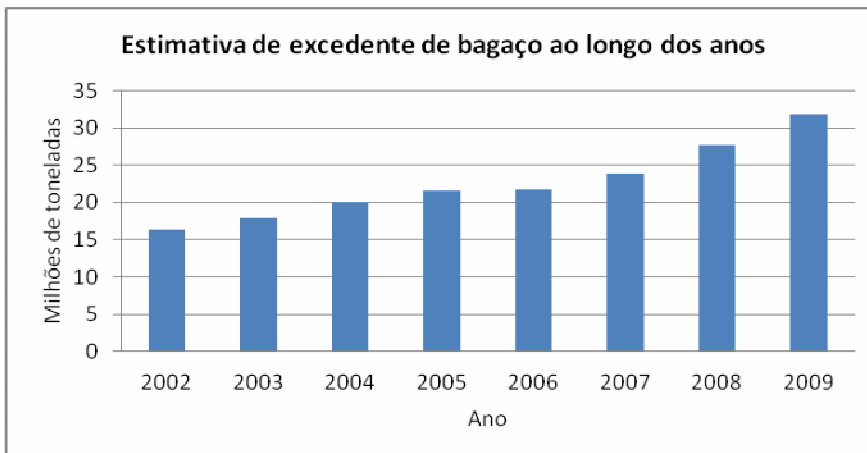


Figura 1- Estimativa do excedente de bagaço de cana considerando que 90% deste material é queimado nas caldeiras.

Fonte: UNICA, 2010.

A Figura 2 mostra uma estimativa para o potencial de transformação da fração de celuloses em etanol levando em conta dois cenários, sendo um mais conservador e outro mais otimista com relação a produção de 2009/10.

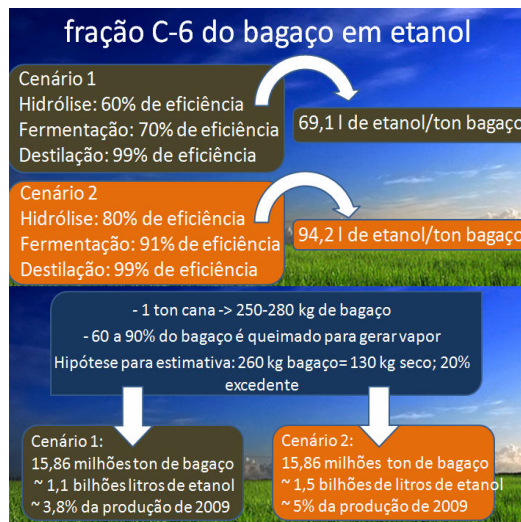


Figura 2- Estimativa de produção de etanol empregando bagaço de cana-de-açúcar em dois cenários.

Fonte: CGEE, 2009.

Pode-se perceber claramente pelo cenário 1 (mais conservador) que a utilização do bagaço excedente pode aumentar a produção de etanol (3,8% a mais da produção de 2009/10).

2.2. Estrutura do bagaço de cana-de-açúcar

Uma das dificuldades de conversão da biomassa em biocombustíveis ou outros produtos de interesse vem do fato de que estes materiais apresentam uma complexa estrutura morfológica.

Os materiais lignocelulósicos são compostos principalmente de três polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, estruturas estas responsáveis por criar uma barreira natural contra a ação de microorganismos. O estudo de cada um destes componentes presentes na estrutura do bagaço de cana, por exemplo, nos leva a compreender melhor sua complexidade.

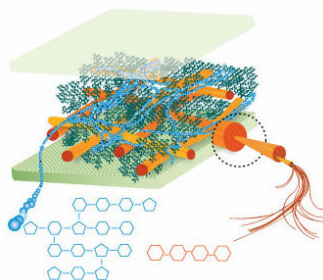


Figura 3 - Estrutura dos materiais lignocelulósicos.

Fonte: www.ceres.net

A celulose é um polímero linear e cristalino, sua estrutura é rígida e um severo pré-tratamento é requerido para quebrar este arranjo (OLSSON *et al.*, 1996). Ela é composta de unidades de beta-D-glucopiranosose ligadas por ligações glicosídicas (β 1-4).

As unidades da fibra de beta-D-glucopiranosose ficam acopladas de modo tal que compostos como HO-2, HO-3, e CH₂OH ficam orientados equatorialmente formando cadeias lineares (Figura 5).

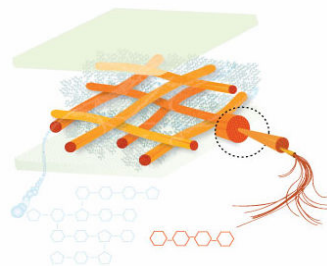


Figura 4 - Estrutura da celulose.

Fonte: www.ceres.net

Uma fibra de celulose pode conter cerca de 5.000 a 10.000 unidades de glicose. A unidade de repetição do polímero de celulose consiste em duas unidades de glicose anidra, chamada de unidades de celobiose (MOHAN et al, 2006).

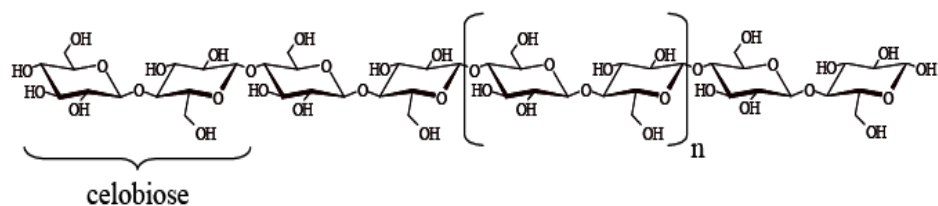


Figura 5 - Representação da cadeia linear da celulose.

O segundo maior constituinte da biomassa é a hemicelulose composta de heteropolímeros ramificados e lineares como: L-arabinose, D-galactose, D-glicose, D-manose e D-xilose (Figura 6). Grupos metil e acetil encontram-se também ligados a sua cadeia de carbono (OLSSON *et al.*, 1996).

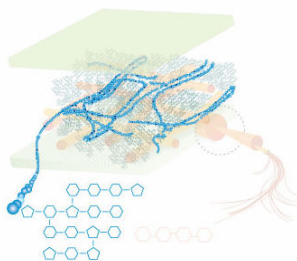


Figura 6 - Estrutura da hemicelulose.

Fonte: www.ceres.net

A quantidade de hemicelulose varia conforme a origem do material lignocelulósico (entre 25 a 35%). Sua estrutura não é cristalina, e ao contrário da celulose é facilmente hidrolisada. Xilose e arabinose são dois dos principais constituintes da hemicelulose.

A elasticidade e flexibilidade características do agregado podem estar relacionadas às cadeias laterais da hemicelulose que interagem facilmente com a celulose, estando depositadas de forma intercalada nas microfibrilas de celulose em um estágio anterior à lignificação (RAMOS, 2003). Essas cadeias laterais permitem ainda que a hemicelulose interaja tanto com celulose quanto com lignina, funcionando como um ligante entre esses dois polímeros, o primeiro polar e o segundo apolar.

Outro constituinte importante dos materiais lignocelulósicos é a lignina, cuja função principal é de dar sustentação a toda esta estrutura. Ela é formada de uma complexa estrutura de polímeros amorfos e possui característica hidrofóbica. Além disso, ela auxilia no transporte de água na planta e no sequestro de carbono (Figura 7).

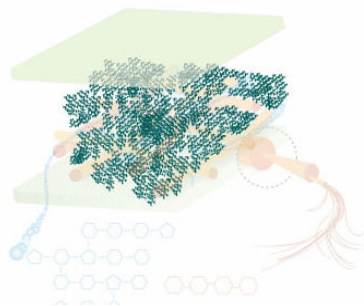


Figura 7 - Estrutura da lignina.

Fonte: www.ceres.net

A lignina é altamente ramificada e frequentemente esta ligada as fibras da celulose formando um complexo lignocelulósico. Este complexo e a lignina sozinha são frequentemente muito resistentes à conversão por sistemas biológicos e muitos agentes químicos. A lignina varia entre 10 a 40% dependendo da origem da biomassa (MOHAGHEGHI *et al.*, 2002).

Dados apresentados na Conferência Nacional de Biocombustíveis BIOCONFE (2008) a estrutura do bagaço de cana *in natura* apresenta: 40 a 50% de celulose, 20 a 40% de hemicelulose e 10 a 20% de lignina.

Veremos nos próximos itens que a remoção dos componentes tais como, lignina e hemicelulose são essenciais para a produção de biocombustíveis com materiais lignocelulósicos.

2.3. Produção de etanol de segunda geração

O processo para produção de etanol a partir do bagaço de cana envolve quatro etapas principais: pré-tratamento do bagaço, hidrólise do material pré-tratado, fermentação do hidrolisado (hexoses proveniente da celulose) e destilação do fermentado.

Primeiro a porção de hemicelulose e celulose devem estar acessíveis para em seguida serem hidrolisadas e transformadas em açúcares através de um processo chamado de sacarificação ou hidrólise. Estes açúcares, entretanto, são uma complexa mistura entre pentoses (gerada pela hidrólise da hemicelulose) e hexoses (geradas pela hidrólise da hemicelulose, em menor quantidade, e da celulose) que trazem um grande desafio para a fermentação, no caso da fração de pentoses. Este trabalho trata apenas da fermentação da fração de hexoses gerada pela hidrólise das celuloses.

2.3.1. Etapa de pré-tratamento

Os materiais lignocelulósicos não contêm monossacarídeos prontos para a bioconversão. Ao invés disso, eles contêm polissacarídeos, como celulose e hemicelulose, os quais devem ser hidrolisados por ácido ou enzimas até se tornarem açúcares fermentecíveis (CARDONA *et al.*, 2010).

A hidrólise enzimática é um caminho promissor para se obter açúcares de materiais lignocelulósicos, mas o difícil acesso das enzimas ao substrato é a chave do problema para a conversão de biomassa a etanol.

A primeira etapa (pré-tratamento) é realizada para aumentar a área de superfície do substrato, reduzir a cristalinidade da celulose, e desorganizar o

complexo lignocelulósico (SZCZODRAK *et al.*, 1996), na intenção de torná-lo mais acessível às enzimas na etapa de hidrólise.

Sem nenhum pré-tratamento, a conversão da celulose em açúcares é extremamente lenta, pois a celulose é protegida por uma matriz de lignina e hemicelulose. Assim sendo, o pré-tratamento desses materiais é necessário para aumentar o desempenho da hidrólise (GALBE *et al.*, 2002).

Um pré-tratamento eficiente deve reduzir a quantidade de enzimas, a qual é responsável por grande parte no custo de produção (HAHN-HAGERDAL, 2006).

Este processo pode ser executado por métodos físicos, químicos ou biológicos tais como pré-tratamento com vapor, moagem, explosão, tratamento ácido (ácido hidrocloreídrico, fosfórico, sulfúrico), tratamento alcalino (hidróxido de sódio, amônia), tratamento com solventes orgânicos (etanol, glicol etileno) ou fungos (SADLLER *et al.*, 1993 & FAN *et al.*, 1983).

Os principais objetivos de um pré-tratamento adequado são segundo HIMMEL 2008:

- Produzir um material pré-tratado facilmente hidrolisável;
- Não degradar celuloses;
- Não inibir a fermentação;
- Requerer nenhuma ou pouca redução do tamanho da biomassa;
- Trabalhar com reatores de custo e tamanhos moderados;
- Reduzir a produção de resíduos sólidos;
- Ser simples e eficaz.

Serão citados a seguir alguns tipos de pré-tratamentos mais utilizados encontrados na literatura.

2.3.1.1. Pré-tratamentos de descompressão rápida

2.3.1.1.1. Pré-tratamento de explosão a vapor

Também chamado de pré-tratamento de autohidrólise refere-se à técnica de pré-tratamento na qual o material lignocelulósico é rapidamente aquecido por vapor de alta pressão sem adição de qualquer químico. A mistura biomassa/vapor é mantida por um período de tempo até promover a hidrólise da hemicelulose, e é finalizada com uma descompressão explosiva (BALAT, 2008).

Hemicelulose pode ser hidrolisada pelo ácido acético ou outros ácidos durante este tipo de pré-tratamento. As vantagens deste tipo de tratamento são baixa consumo de energia comparada com tratamentos mecânicos e o não envolvimento de reciclo, por exemplo. Este tipo de pré-tratamento é considerado a opção com o maior custo-benefício para resíduos agrícolas (BALAT, 2008).

2.3.1.1.2. Pré-tratamento AFEX

O pré-tratamento conhecido como AFEX (*Ammonia Fiber Explosion*) envolve amônia líquida e explosão a vapor. O material lignocelulósico é colocado a um vaso de pressão com amônia líquida (1-2 kg de amônia por kg de biomassa seca). Pressões acima de 12 atm são requeridas para a operação em temperatura ambiente. É um tratamento simples e requer um curto período para processo, entretanto para este método ser economicamente viável ele requer um eficiente processo para recuperação da amônia (BALAT, 2008).

2.3.1.2. Pré-tratamento ácido

Existem muitos tipos de pré-tratamento ácido incluindo o uso de ácido sulfúrico, fosfórico, nítrico ou hidrocloreídrico. Pode ser realizado utilizando tanto ácidos diluídos como concentrados para melhorar a etapa de hidrólise da celulose.

Dentre todos os tipos de pré-tratamento ácido, o com ácido diluído é um dos mais utilizados e amplamente estudados.

Dependendo do substrato e das condições usadas, entre 80% a 95% de açúcares na hemicelulose podem ser recuperados com este tipo de pré-tratamento em uma moderada temperatura de processo (BALAT, 2008).

Segundo NASCIMENTO 2011, uma das vantagens do pré-tratamento ácido é a solubilização de hemicelulose. Entretanto existe o risco de formação de produtos voláteis de degradação do carbono e estes, em muitos casos, diminuem a conversão a etanol. A condensação e a precipitação de componentes de lignina solubilizada é uma reação indesejada, uma vez que diminui a digestibilidade. Pré-tratamentos com ácido concentrado para a produção de etanol não são processos atrativos, devido ao grande risco de produção de componentes inibidores pela degradação de carboidratos.

2.3.1.3. Pré-tratamento alcalino

Dentre os diversos pré-tratamentos estudados na literatura o pré-tratamento alcalino tem despertado bastante atenção por ser relativamente mais econômico para muitos materiais lignocelulósicos (BELKACEMI *et al.*, 1998).

Além disso, tratamentos alcalinos utilizam valores baixos de pressão e temperatura se comparado com outras tecnologias de pré-tratamentos. Pode também ser processado em condições ambientes, porém exigindo um período muito grande (horas ou dias ao invés de minutos ou segundos).

A aplicação de soluções alcalinas remove grande parte da lignina, por meio do rompimento das ligações estruturais, melhorando a reatividade dos polissacarídeos remanescentes (MOSIER *et al.*, 2005).

2.3.1.3.1. Pré-tratamento com NaOH

Hidróxido de sódio é um dos mais efetivos agentes alcalinos e tem sido utilizado para tratar diversos tipos de materiais lignocelulósicos (SOTO *et al.*, 1994). Este tipo de pré-tratamento não hidrolisa a hemicelulose tão efetivamente quanto pré-tratamentos que utilizam ácidos, porém é efetivo na remoção de lignina, o que traz um aumento na digestibilidade enzimática do material (HIMMEL, 2008).

A característica do pré-tratamento alcalino com NaOH é que este pode remover a lignina sem afetar muito outros componentes (BALAT, 2008). Considerando aspectos econômicos e ambientais, o tratamento com NaOH diluído pode ser melhor do que com NaOH concentrado.

SILVERSTEIN *et al.*, 2007 investigou o pré-tratamento químico de caule de algodão e reportou que dentre os quatro pré-tratamentos avaliados (NaOH, H₂SO₄, H₂O₂ e ozônio), o que empregou NaOH resultou no mais alto nível de deslignificação (65,6% com 2% de NaOH, 90 min, 121°C) e conversão de celulose (60,8%).

MACDONALD *et al.* (1983) reportou que quase toda a lignina na palha do milho foi dissolvida após pré-tratamento utilizando 2% de NaOH a 50°C por 15 minutos.

NASCIMENTO, 2010 obteve no pré- tratamento do bagaço de cana-de-açúcar (NaOH 7% por 30 minutos a 120 °C) deslignificação do material, resultando em 5% de lignina na biomassa, teor de celulose em torno de 38%, garantindo assim um alto conteúdo acessível de celulose para a degradação enzimática, com uma conversão em torno de 75,5% (hidrólise) com rendimento em etanol de 90%.

A grande maioria dos estudos realizados com pré-tratamento empregando NaOH utilizaram temperaturas acima de 100°C. Entretanto, reagentes alcalinos como amônia, têm demonstrado serem mais promissores trabalhando com temperaturas mais baixas (55 °C), porém um maior tempo de processamento é requerido (KIM *et al.*, 2005).

2.3.1.3.2. Pré-tratamento com NH₄OH

A utilização de hidróxido de amônio oferece algumas vantagens como pré-tratamento por ser não poluente e poder ser reciclado devido a sua alta volatilidade (KIM *et al.*, 2005). Este tipo de pré-tratamento tem sido estudado em diferentes materiais lignocelulósicos usando vários processos, em que, na maioria deles são utilizadas temperaturas altas, resultando em alta deslignificação. Entretanto, para estes processos a grande desvantagem é o alto consumo energético, formação de produtos tóxicos e perda de açúcares (KIM *et al.*, 2005). Menores temperaturas neste pré-tratamento tem sido estudada para contornar estes desafios. Vários estudos reportam que o uso de amônia em temperaturas mais amenas minimiza sua

interação com a hemicelulose e a formação de compostos tóxicos, aumentando a bioconversão e os rendimentos na fermentação.

SILVA, 2011, realizou experimentos de pré-tratamento empregando solução de hidróxido de amônio (concentrações de 4, 5, 10 e 15%) a 100 °C e 60 minutos. Para a amostra de bagaço *in natura* o melhor resultado foi obtido para o tratamento que empregou a solução alcalina na concentração de 10% (perda de celulose insignificante com boa remoção de hemicelulose, 63,1%, e lignina, 74,7%). Para a amostra de bagaço explodido a vapor o melhor resultado foi para solução empregando 15% de hidróxido de amônio (perda de celulose, 1,6%, remoção de hemicelulose, 87,6% e de lignina, 67,8%).

2.3.1.4. Pré-tratamento biológico

No pré-tratamento biológico são utilizados fungos para solubilizar a lignina. Biodelignificação é a degradação biológica da lignina por microorganismos. Estas tecnologias poderiam simplificar o pré-tratamento, mas são lentos, com baixos rendimentos e há muito pouca experiência com este tipo tratamento (BALAT, 2008).

2.3.1.5. Pré-tratamentos físicos

2.3.1.5.1. Cominuição

A cominuição do material lignocelulósico tem sido muito utilizada como processo de pré-tratamento. Esses métodos incluem vários tipos de moedores de bola (processo a seco, umido e vibratórios), moedores de atrito, compressão, etc.

Enquanto esses métodos podem aumentar a digestibilidade enzimática aumentando a área superficial da biomassa e reduzindo a cristalinidade da celulose, muitos estudos concluíram que o alto consumo de energia requerido faz com que a cominuição seja um processo com um alto custo para ser utilizado no processo de conversão de biomassa em etanol (HIMMEL, 2008). O mesmo acontece com

tratamentos físicos como a irradiação que envolve um gasto com energia muito grande (HIMMEL, 2008).

2.3.1.6. Pré-tratamento com solventes

2.3.1.6.1. Solventes orgânicos

Muitas misturas de solventes orgânicos utilizando metanol, etanol, acetona, entre outros, segundo HIMMEL, 2008, tem sido utilizados como pré-tratamentos de biomassa no processo de solubilização de lignina. Alguns desses processos são conhecidos como processos organosolv.

Solventes podem ser recuperados e reciclados utilizando processos apropriados de extração e separação sem deixar nenhum nível de inibição que possa afetar o processamento biológico desse material.

O Quadro 1 mostra alguns métodos utilizados para pré-tratamento de matérias lignocelulósicas.

Quadro 1. Métodos de pré-tratamentos de materias lignocelulósicos para hidrólise enzimática.		
Método	Processo	Mecanismo de alteração da biomassa
Pré-tratamentos Físicos	<ul style="list-style-type: none"> - Moinho de bolas; - Moinho de rolos; - Moinho de martelos; - Hidrotérmico; - Extrusão; - Expansão; - Irradiação microondas; - Irradiação por raios gamas; 	<ul style="list-style-type: none"> - Aumentando a área de contato e o tamanho de poros; - Diminuindo a cristalinidade da celulose e seus graus de polimerização; - Hidrólise parcial das hemiceluloses; - Depolimerização parcial da lignina;
Pré-tratamentos Físico-químicos e químicos	<p>Explosão:</p> <ul style="list-style-type: none"> - explosão a vapor; - AFEX; - CO₂ -SO₂ <p>Alcalinos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hidróxido de sódio; - Amônia; - Sulfato de amônia; <p>Gás:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dióxido Clorino; - Dióxido de nitrogênio <p>Ácido:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sulfúrico; - Hidroclórico; - Fosfórico; - Dióxido sulfuroso; <p>Agentes oxidantes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Peroxido de hidrogênio; <p>Solventes de celulose:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cadoxen; - CMCS; <p>Solvente de lignina:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Etanol-água extração; - Benzeno-água extração; 	<ul style="list-style-type: none"> - Delignificação; - diminuição do grau de cristalinidade e grau de polimerização da celulose; - parcial ou completa hidrólise da hemicelulose;
Pré-tratamentos biológicos	<ul style="list-style-type: none"> - Actinomycetes - Fungi 	<ul style="list-style-type: none"> - delignificação - redução do grau de polimerização da hemicelulose e celulose;

Fonte: TAHERZADEH *et al*, 2007

Dentre as muitas opções, segundo RAMOS, 2000, a explosão a vapor é uma técnica que se mostra versátil e atraente, particularmente em função do processo agro-industrial que se encontra instalado (disponibilidade de vapor no processo nas unidades industriais).

2.3.2. Hidrólise

Após o pré-tratamento é realizada a hidrólise que pode ser tanto por ácidos fracos como por ação de enzimas. A última se mostra com um maior potencial para desenvolvimento por ser mais seletiva e necessitar de equipamentos menos rigorosos do que a hidrólise ácida (LYND *et al*, 1996).

O Quadro 2 apresenta uma comparação entre a hidrólise enzimática e a hidrólise com ácido diluído.

Quadro 2 – Comparação entre hidrólise ácida e hidrólise enzimática		
Variável comparada	Hidrólise enzimática	hidrólise com ácido diluído
Condições amenas de hidrólise	Sim	Não
Altos rendimentos de hidrólise	Sim	Não
Produção de inibidores durante a hidrólise	Sim	Não
Formação de inibidores como subproduto	Não	Sim
Baixo custo de catalisadores	Não	Sim
Baixo tempo de hidrólise	Não	Sim

Fonte: TAHERZADEH *et al*, 2007

A hidrólise é responsável pela transformação da celulose em glicose, e, no caso da hidrólise enzimática, esse processo ocorre catalisado por um coquetel de enzimas.

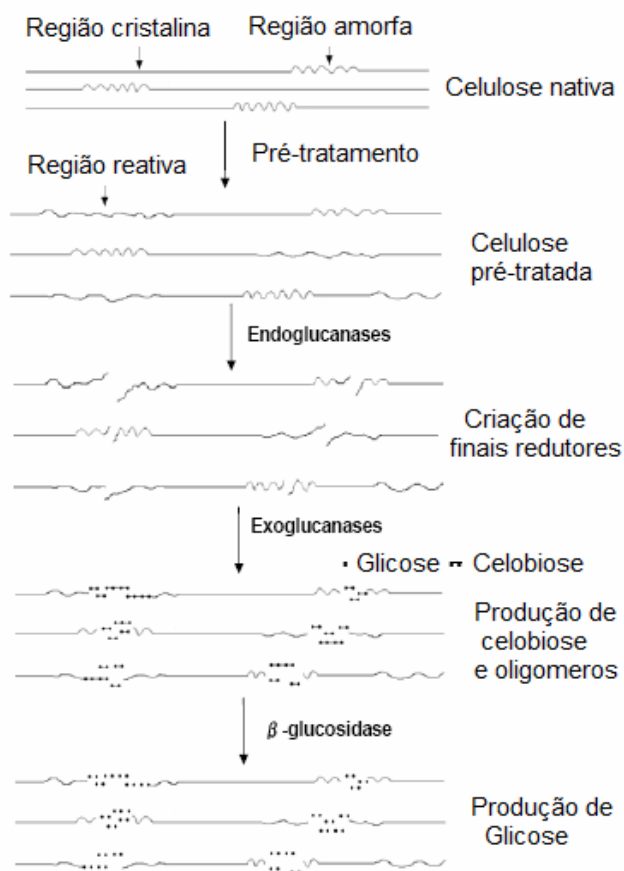
Enzimas comerciais têm sido muito usadas para converter o bagaço de cana em açúcares fermentecíveis. Hidrólise enzimática utilizando-se celulasas pode ser um caminho promissor para atingir altos valores de produtividade (LYND *et al.*, 1996).

As enzimas celulases utilizadas para a hidrólise enzimática de matérias lignocelulósicas podem ser produzidas por bactérias ou fungos, os quais podem ser aeróbicos ou anaeróbicos, mesofílicos ou termofílicos. Dentre as bactérias produtoras de celulase pode-se citar: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, *Streptomyces* (RABINOVICH *et al*, 2002). Os fungos filamentosos são os maiores produtores de celulases e hemicelulases. Linhagens mutantes e selvagens de *Trichoderma sp.* (*T. viride*, *T. reesei*), têm sido consideradas as mais produtivas. As enzimas destas linhagens tem se mostrado mais eficientes na hidrólise da porção de celulose cristalina (RABINOVICH *et al*, 2002)..

Os três principais grupos de celulases são (LYND *et al*, 1996):

1. Endoglucanases ou endo-1,4- β -glucanases (EG); (EC 3.2.1.4);
2. Exoglucanases ou cellobiohidrolases (CBH); (EC 3.2.1.74, EC 3.2.1.91);
3. β -Glucosidases (BGL); (EC 3.2.1.21).

As endoglucanases têm um importante papel na hidrólise. Elas hidrolisam as cadeias de celulose em regiões amorfas. Ligações intramoleculares β -1,4-glicosídicas da cadeia de celulose são hidrolisadas aleatoriamente pela EG, produzindo novos finais de cadeias. As exoglucanases clivam os finais das cadeias de celulose produzindo celobiose ou glicose solúveis. Celobiose é finalmente hidrolisada para glicose pelas BGLs, reduzindo a inibição da celobiose (Figura 8).



Fonte: TAHERZADEH *et al*, 2007.

Figura 8 - Representação esquemática da hidrólise de celulose para glicose por ação de celulases.

A hidrólise enzimática é dependente de muitos fatores: tipo de substrato pré-tratado, inibição da atividade enzimática por produtos finais da biodegradação, termoestabilidade das enzimas, suas concentrações e adsorção no substrato, duração da hidrólise, pH do meio, concentração de substrato no meio e taxa de agitação deste (HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2006). As condições de temperaturas e pH ótimos de diferentes celulases são usualmente reportadas na faixa de 40 a 50° C a pH de 4 a 5 (OLSSON *et al*, 1996).

Um dos principais fatores que afetam o rendimento e a taxa inicial de hidrólise é a concentração de celulose e hemicelulose no substrato. Uma alta concentração

pode causar inibição, mas isto também depende da razão entre enzima e substrato (SUN *et al*, 2002). Segundo WU *et al*, 1998, a adição de surfactantes ajuda a reduzir a carga enzimática em até 50%, mantendo a mesma conversão de celulose. Outra importante estratégia para se reduzir o custo com enzimas no processo de hidrólise enzimática é a reciclagem das enzimas celulases (TU *et al*, 2007).

A reciclagem de enzimas pode ser utilizada quando estas se encontram imobilizadas. O uso de enzimas imobilizadas para o processo de hidrólise foi estudada por diversos autores. LEE e WOODWARD, 1983 estudaram a co-imobilização de beta-glucosidase e um microorganismo para fermentação, na intenção de melhorar a conversão de celulose para etanol.

Além de estudos no processo de hidrólise em si, pode-se obter melhores resultados alterando-se a configuração do mesmo. Pode-se na hidrólise conduzir esta etapa simultaneamente com a fermentação (*Saccharification with a simultaneous fermentation*), chamado de processo SSF, ou realizar a fermentação de forma separada (*Separated Enzymatic hydrolysis and fermentation*) chamada de SHF. Essas duas configurações apresentam certas vantagens e desvantagens.

2.3.2.1. Hidrólise e fermentação separadas (SHF)

Neste processo a hidrólise da celulose e a fermentação do hidrolisado são realizadas em unidades separadas. A principal vantagem deste tipo de processo é a possibilidade de se conduzir a hidrólise e fermentação em suas condições ótimas de pH e temperatura. Para a hidrólise temperatura entre 40 e 50° C e para a fermentação entre 30 e 37° C. Entretanto a inibição pela celobiose é a principal desvantagem dessa configuração.

Resultados apresentados por SANTOS *et al*, 2010, atingiram cerca de 40% de conversão (para 10 horas de experimento) utilizando esta configuração com bagaço pré-tratado com explosão a vapor.

2.3.2.2. Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)

Neste processo, a glicose produzida pelas enzimas é consumida imediatamente pelo microorganismo responsável pela fermentação. Esta é a grande vantagem do processo SSF comparado com o processo SHF, pois a inibição da celobiose e glicose para as enzimas é minimizada mantendo uma baixa concentração desses componentes no meio. Outra vantagem é que neste processo o risco de contaminação é reduzido quando comparado com o SHF, pela presença de etanol no meio. A maior dificuldade está em achar a condição ideal, principalmente para a temperatura e pH deste processo. Segundo TAHERZADEH *et al*, 2007, a melhor temperatura para se conduzir este processo utilizando-se de celulasas (*T. reseei*) e *S. cerevisiae* foi de 38° C. Outra dificuldade neste processo está na inibição da celulase pelo etanol. Foi reportado por WYMAN, 1996 que uma concentração de 30 g/l de etanol pode reduzir a atividade da enzima em 25%. Experimentos realizados por SANTOS *et al*, 2010, com este tipo de configuração e utilizando bagaço de cana pré-tratado com explosão a vapor obtiveram uma conversão enzimática de 49% após 10 horas de hidrólise.

A Figura 9 mostra um esquema dos dois diferentes tipos de configurações que podem ser utilizados na hidrólise enzimática.

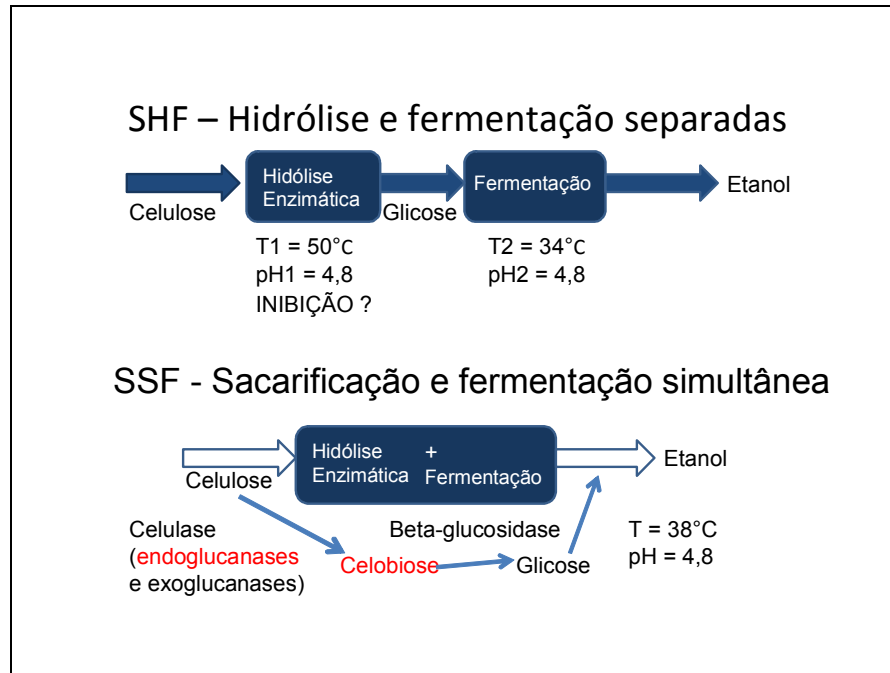


Figura 9 - Comparação entre hidrólise SHF e SSF.

Segundo SANTOS *et al*, 2010, nos processos em SSF com pré-sacarificação a conversão enzimática após 16 horas foi muito próxima àquela obtida em período semelhante no processo em SHF, sendo relatado que no processo SSF foi utilizada uma menor quantidade de enzima (dado não apresentado pelos autores).

2.3.3. Fermentação de hidrolisados em materiais lignocelulósicos

A fermentação alcoólica é um processo biológico no qual compostos orgânicos, como açúcares, são convertidos por microorganismos em componentes mais simples. No caso da fermentação alcoólica, esses componentes mais simples seriam o etanol e o CO_2 . Historicamente, o microorganismo mais comumente utilizado neste processo, tem sido as leveduras, dentre elas a *Saccharomyces cerevisiae* tem se destacado.

Como nos processos anteriores, existem diversas configurações para se realizar a fermentação dos hidrolisados de materiais lignocelulósicos, tanto se tratando na configuração do sistema (batelada, CSTR, dentre outras) como também

do microrganismo utilizado, que pode ser levedura, bactérias ou fungos. O ideal na etapa de fermentação seria a utilização de reatores bateladas com leveduras *S. cerevisiae*, já que o sistema para produção de álcool no Brasil trabalha desta maneira, e assim, uma adaptação para este processo seria mais simples. Foi citado por OLSSON *et al.* 1996 que os dois principais problemas para o processo de fermentação de materiais lignocelulósicos são:

- Primeiro, depois do pré-tratamento, o material hidrolisado contém não somente açúcares fermentecíveis, mas também muitos componentes que apresentam efeito inibidor para os microorganismos utilizados na fermentação;
- Segundo, a hemicelulose hidrolizada contém não somente hexoses mas também pentoses. Hexoses podem ser facilmente fermentadas como é já realizada no processo de primeira geração por *Saccharomyces cerevisiae*. As pentoses, porém, são mais difíceis para fermentar.

Segundo KRISTENSEN *et al.*, 2009 trabalhar com concentrações de sólidos alta na hidrólise enzimática para conversão de celulose é uma vantagem pois aumenta-se a concentração do produto e a produtividade da planta enquanto diminui-se o gasto com água e energia no processo.

Em paralelo com estudos que vem sendo desenvolvidos para a fermentação de pentoses, hidrólises com alta carga de sólidos, dentre outros estudos, devemos considerar tudo como parte integrante de um processo que pode ser realizado até mesmo com o processo já existente de primeira geração. Para isso, deve-se levar em conta a integração de energia, a recuperação de enzimas, recirculação de água no processo dentre outros rearranjos, como por exemplo, proceder a hidrólise e fermentação de forma simultânea (SSF) diminuindo riscos de contaminação, dentre outras muitas alternativas existentes. A Figura 10 mostra um esquema do processo de produção de etanol com bagaço proposto por OLSSON, 1996.

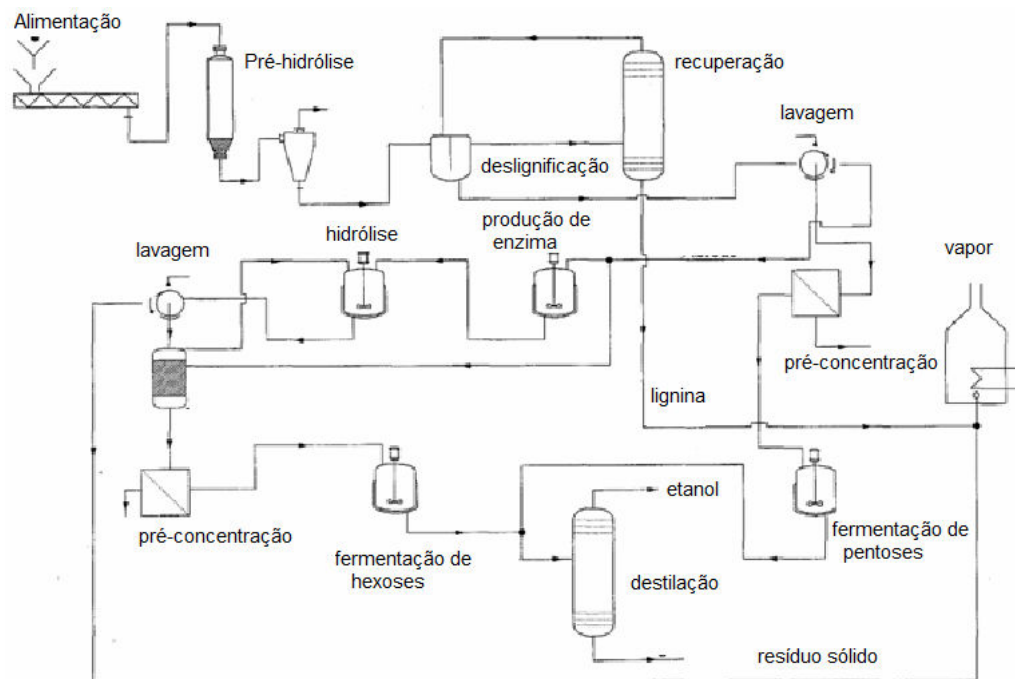


Figura 10 - Fluxograma proposto por OLSSON, 1996 para produção de etanol celulósico.

2.4. Dados do setor

Uma visão geral do histórico do setor sucro-álcooleiro no Brasil, seu impacto na economia do país e a sua contribuição com relação ao meio ambiente comparado com combustíveis fósseis são apresentados a seguir.

2.4.1. Dados históricos

No Brasil, as indústrias de açúcar e de álcool estiveram sempre intimamente ligadas, desde o tempo do descobrimento. A produção de etanol iniciou-se na capitania de São Vicente, porque nela foi montado o primeiro engenho de açúcar do país, após a vinda das primeiras mudas de cana-de-açúcar, trazidas da ilha da madeira em 1593.

Se verificarmos a matriz energética brasileira atual (Figura 11) observa-se que o Brasil possui uma posição privilegiada com mais de 45% de seus recursos constituídos de energia renovável.

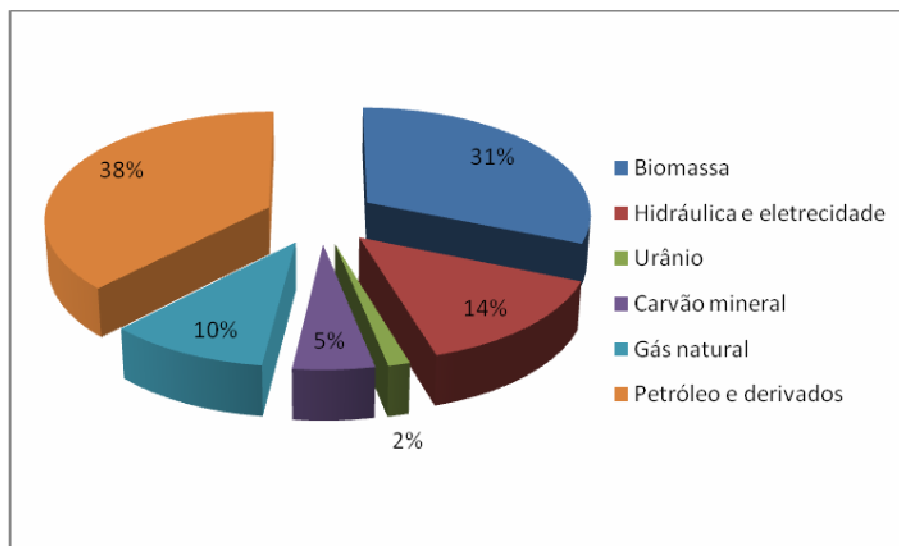


Figura 11 – Matriz energética brasileira

Fonte: MME, 2010

Dentre os tipos de energia utilizados no Brasil, destaca-se a energia hidráulica e a de produtos da cana-de-açúcar, mas especificamente o etanol usado nos motores de veículos.

Este cenário se deve muito a estratégia brasileira adotada na década de 70 com a tentativa de diminuir a dependência do petróleo, pois este estava com preços altíssimos. O Pró-álcool foi o programa criado para incentivar a indústria da cana a produzir etanol. Desde então, a produção de álcool assumiu um importante patamar na matriz energética brasileira.

Segundo PELLEGRINI, 2009 o programa do Pró-álcool pode ser dividido em três importantes fases para a indústria sucroalcooleira:

- *de 1975 a 1979*: chamada de “expansão moderada”, marcada pelo aumento de produção do álcool anidro, via capacidade ociosa existente (destilarias anexas), baixa adesão da indústria automobilística e alta concentração de recursos públicos para o financiamento do programa;

- *de 1980 a 1985*: foi a “expansão acelerada”, marcada pela expansão da produção de álcool hidratado a partir de destilarias autônomas e um aumento substancial da produção/venda de carros a álcool;
- *de 1986 a 1995*: “desaceleração e crise”, marcada pela diminuição dos preços do petróleo no mercado internacional, aumento da produção nacional de petróleo, fim dos incentivos estatais, crise de abastecimento e retração do mercado.

Em 2001 presenciamos o chamado “apagão” com o objetivo de racionamento de energia elétrica no país; o governo iniciou então um programa de incentivo para fontes alternativas de geração de eletricidade (biomassa, eólica, etc).

Os carros *flex fuel* em 2003, o aumento nos preços de barris de petróleo, e uma nova consciência com relação ao meio ambiente, faz com que a busca pelo etanol se tornasse maior ainda a partir de então, proporcionando, assim, um aumento da competitividade dentro do setor, um melhoramento de eficiência no processo de produção e a aquisição de novas estratégias para diferenciação de produtos.

Por este breve histórico percebe-se uma grande evolução na agroindústria brasileira que passou a produzir não somente um único produto (o açúcar) mas diversos outros. Esta complexa indústria com diversos produtos e possibilidades marca uma nova definição da indústria de açúcar e álcool, a de biorefinaria.

2.4.2. Dados econômicos

A cana-de-açúcar é a segunda maior fonte de energia renovável do Brasil, com 14,6% de participação na matriz energética atual, considerando-se o álcool combustível e a co-geração de eletricidade, a partir do bagaço. Dos 6 milhões de hectares, cerca de 85% da cana-de-açúcar produzida no Brasil está na Região Centro-Sul (concentrada em São Paulo, com 60% da produção) e os 15% restantes na Região Norte-Nordeste.

A Figura 12 representa a produção de etanol total no Brasil ao decorrer dos anos.

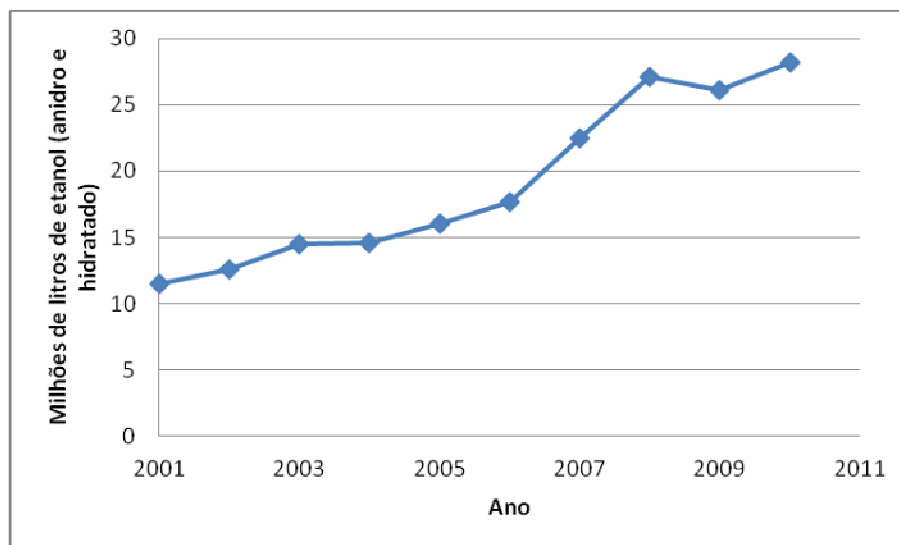


Figura 12 - Produção de etanol no Brasil

Fonte: ANP, 2010.

O aumento de vendas de carros movidos a álcool e o aumento nos preços do barril de petróleo contribuiu para que cada vez mais se aumentasse a produção de etanol no Brasil e no mundo.

Em 1988, perto de 30% da frota automotiva brasileira rodou com etanol hidratado, enquanto que, atualmente, toda a frota brasileira utiliza ou o etanol hidratado (95-96%) ou uma mistura de até 26% de etanol na gasolina (RAMOS, 2000).

A Figura 13 mostra a evolução no preço do petróleo ao longo dos anos, outro fator que contribuiu para o aumento na produção e uso do etanol.

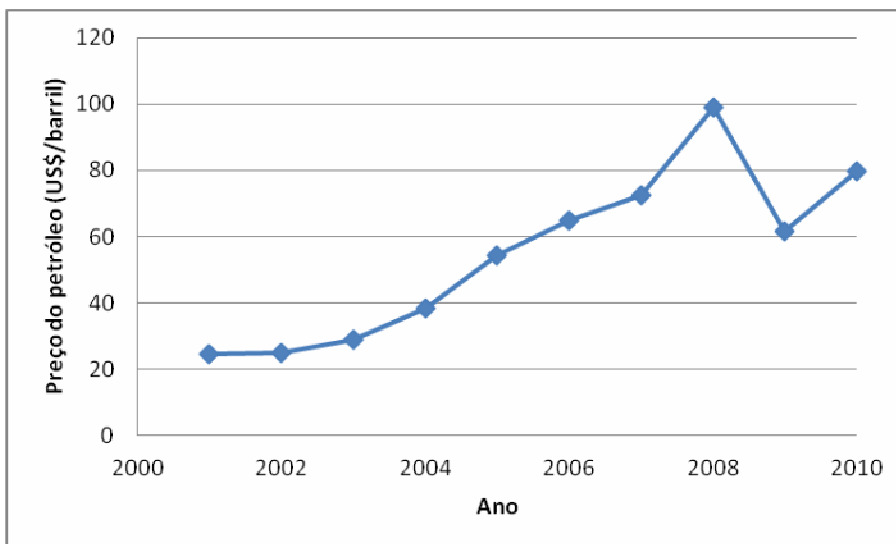


Figura 13 – Evolução do preço do barril de petróleo (em dólar/barril) ao longo dos anos.

Fonte: ANP, 2011.

O fato de o Brasil possuir um papel importante no cenário mundial de produção de etanol se deve em grande parte a política do Pro-álcool instalada no Brasil no início da década de setenta. O Pro-álcool forneceu subsídios para a implantação de unidades produtoras de álcool pelas indústrias açucareiras com pequenos investimentos de seus proprietários. Com este programa, o governo tentava diminuir sua vulnerabilidade diante das oscilações de petróleo devido à crise internacional de 1973, produzindo um combustível alternativo a gasolina, oriundo da cana.

Podemos notar a evolução do preço (em reais) do litro de etanol e gasolina no Brasil no período de 2001 a 2010 na Figura 14.

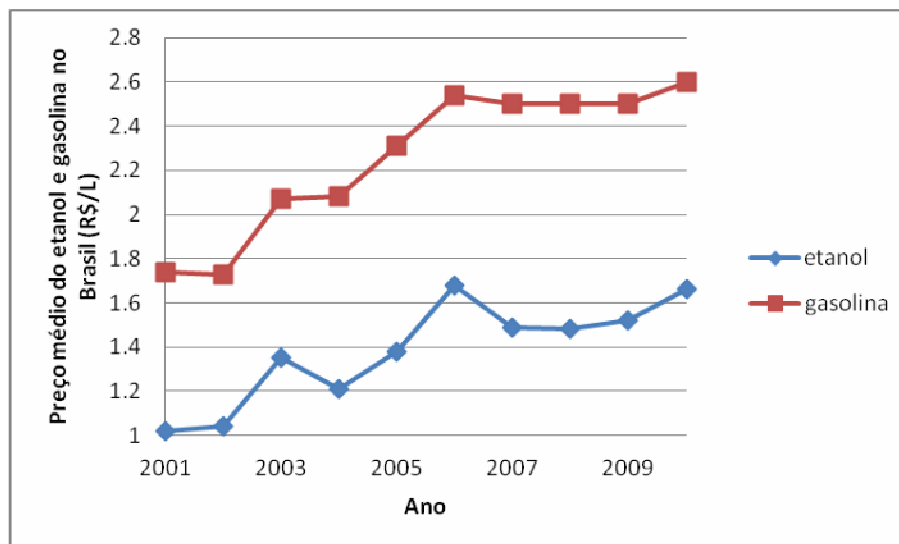


Figura 14 - Preço do etanol e da gasolina no Brasil
Fonte: ANP, 2010.

O etanol, ao longo dos anos, através de incentivos e melhoria no rendimento das usinas atinge preços cada vez mais competitivos no mercado com relação à gasolina.

Devido a competitividade do preço do etanol em relação à gasolina, a maior parte das vendas de carros hoje no Brasil é de modelos *flex fuel*, os quais podem se locomover tanto com álcool como com gasolina (Figura 15).

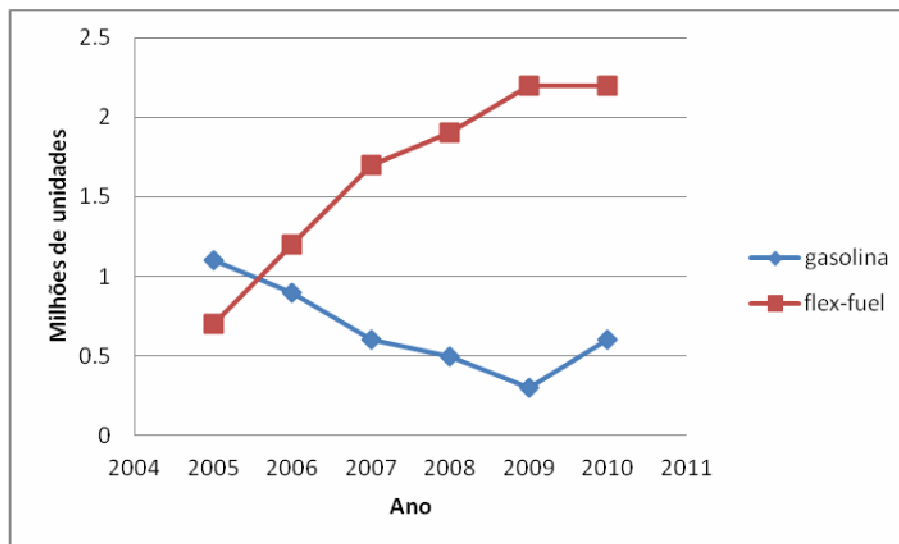


Figura 15 - Fabricação de automóveis no Brasil

Fonte: Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores - Brasil / ANFAVEA, 2011.

Além de toda importância econômica, o etanol também traz muitos benefícios relacionados com o meio ambiente. Estes benefícios são discutidos de forma sintetizada no item a seguir.

2.4.3. Dados ambientais

Outro fator de grande importância a ser levado em consideração nas buscas de novas tecnologias e pesquisas na área de biocombustíveis é o fato da contribuição para o meio ambiente que esses tipos de energias renováveis proporcionam.

Apesar de existir poucos estudos que relacionam emissões de poluentes com energias adicionadas no processo de produção (combustíveis fósseis), pode-se dizer que a produção de etanol no Brasil faz um excelente uso da biomassa. Combustíveis fósseis adicionados no processo são baixos comparados com a produção de etanol nos EUA e Europa.

Alguns trabalhos mostram que para cada unidade de etanol produzida no Brasil, somente 0,1 unidade de energia fóssil é requerida, bem menor que 0,6 a 0,8 requeridas para produzir uma unidade de etanol nos EUA e Europa respectivamente

(IEA, 2004). A Tabela 1 mostra o balanço de energia na produção de etanol a partir de diferentes matérias primas.

Tabela 1. Balanço de energia na produção de etanol com diferentes materias primas Fonte: MACEDO, 2007

Matérias-primas	Energia renovável / energia fóssil usada
Etanol de milho (USA)	1,3
Etanol de cana (Brasil)	8,9
Etanol de beterraba (Alemanha)	2,0
Etanol de sorgo sacarino (África)	4,0
Etanol de trigo (Europa)	2,0
Etanol de mandioca	1,0

Outra grande vantagem do uso de biocombustíveis é o reaproveitamento de resíduos agrícolas, usados na sua produção, sem a necessidade de aumento de áreas produtivas.

Assim, observando brevemente dados históricos, econômicos e ambientais, observa-se de forma mais clara a grande importancia do etanol e seu uso como combustível renovável.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) *in natura* utilizado neste trabalho foi cedido pela Usina Itacema (Itacemópolis, SP). O BCA explodido a vapor (condições da explosão: 17 kgf/cm², 205°C e 20 minutos) foi cedido pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC, Piracicaba, SP).

O extrato enzimático (Accelerase 1500) utilizado neste trabalho foi doado pela empresa GENENCOR (EUA).

Na etapa de fermentação foi utilizada levedura *Saccharomyces cerevisiae* (levedura comercial na forma liofilizada, marca Fleishmann).

Os demais reagentes de laboratório utilizados neste trabalho foram adquiridos em grau analítico e não sofreram qualquer tratamento antes de sua utilização.

3.2. Métodos

3.2.1. Pré-tratamento do bagaço *in natura* e explodido

Em frasco Erlenmeyer ou balão de vidro foi colocada uma amostra de BCA *in natura* ou BCA explodido e água ou solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1% (m/v) na proporção de 1:20 (massa de sólido em base seca para massa de solução). Esta suspensão foi submetida à autoclavagem (120°C) por 30 minutos.

Após autoclavagem, o resíduo sólido foi filtrado. A fração sólida resultante foi então submetida a sucessivas lavagens com água na temperatura de 50 °C para remoção da hemicelulose solubilizado e neutralização. Ao final o material sólido foi filtrado e sua umidade determinada.

Em algumas sequências de pré-tratamento este material foi transferido para frasco Erlenmeyer ou balão de vidro. Adicionou-se solução de NaOH (4% ou 7%, m/m) na mesma proporção líquido-sólido já descrita. Procedeu-se a etapa de deslignificação do material por meio de nova autoclavagem (120 °C por 30 minutos). Ao final, o resíduo sólido foi lavado abundantemente com água quente até que o filtrado não mais apresentasse coloração amarelada no efluente da lavagem e o pH

atingisse valor neutro. Este sólido foi submetido à última lavagem com tampão citrato de sódio (pH=4,8) e filtrado em seguida, tendo ao final sua massa e umidade determinadas. Este material passou a ser denominado de BCA pré-tratado. O material foi armazenado em geladeira até sua utilização nos experimentos de hidrólise.

Em uma das seqüências de pré-tratamento realizou-se apenas a autoclavagem (120 °C) por 30 minutos do BCA *in natura* com solução de NaOH 7% (a primeira autoclavagem com água ou solução de ácido sulfúrico não foi realizada).

A Figura 16 apresenta fotografia com frascos Erlenmeyer e balões de vidro contendo os materiais após a segunda autoclavagem.



Figura 16 - Fotografia dos frascos Erlenmeyer e balão de vidro ao final da etapa de pré-tratamento (etapa de deslignificação) das amostras de BCA *in natura* e explodido (deslignificação com solução de NaOH).

3.2.2. Pré-tratamento do bagaço *in natura* e explodido com solução de hidróxido de amônio.

Amostras de BCA *in natura* ou explodido a vapor foram adicionadas a uma autoclave de aço inoxidável cilíndrica (volume útil de aproximadamente 200 cm³, Figura 17) com solução de hidróxido de amônio 15% (m/m) na proporção de 1:5 (massa de sólido para massa de solução). A autoclave foi fechada e imersa em um

recipiente com água em ebulição por período de uma hora. Em seguida, após o resfriamento do equipamento em banho de gelo, o material contido em seu interior foi lavado com água quente até que o filtrado não mais apresentasse coloração amarelada no efluente da lavagem e o pH atingisse valor neutro. A última lavagem foi realizada com tampão citrato de sódio (pH=4,8). O material foi filtrado e sua umidade determinada. O material foi armazenado em geladeira para ser utilizado nos experimentos de hidrólise.



Figura 17 - Fotografia do reator cilíndrico de aço inoxidável (autoclave) utilizado nos experimentos de pré-tratamento do BCA empregando solução de NH_4OH (Silva, 2011).

3.2.3. Determinação da umidade das amostras de bagaçoError! Reference source not found.

A umidade das amostras de BCA foi determinada empregando determinador de umidade modelo ID50 (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda) a 100°C em modo automático.

3.2.4. Determinação do rendimento na etapa de pré-tratamento

Os rendimentos mássicos das etapas de pré-tratamento avaliadas neste trabalho foram calculados utilizando a equação (1).

$$R = \left(\frac{m_{\text{final}}}{m_{\text{inicial}}} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

onde:

m_{inicial} massa inicial seca de material lignocelulósico (g);

m_{final} massa final seca de material lignocelulósico (g);

R rendimento mássico.

3.2.5. Caracterização das amostras de bagaço de cana-de-açúcar

As amostras de BCA foram caracterizadas utilizando-se metodologia para caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar descrita por GOUVEIA *et al.*, 2009. A fração líquida oriunda da etapa de caracterização foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Cada etapa deste processo de caracterização é descrita nos próximos itens.

3.2.5.1. Hidrólise com ácido sulfúrico 72%

Amostras de 2 gramas de BCA (*in natura*, explodido a vapor e pré-tratado) com 10% de umidade (cominuídas a 20 mesh em moinho de facas) foram transferidas para béqueres de 100 mL e misturadas a 10 mL de solução de ácido sulfúrico 72% em banho termostaticado (Nova Ética) a 45°C por 7 minutos, sob vigorosa agitação. Em seguida as amostras foram transferidas quantitativamente para frascos Erlenmeyers de 500 mL, adicionando-se 275 mL de água destilada. Os frascos Erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 minutos a 120°C.

Após a autoclavagem, aguardou-se o resfriamento do material a temperatura ambiente. Em seguida realizou-se a filtração separando a parte sólida da líquida em papel de filtro qualitativo. A fração líquida foi transferida para balão volumétrico de 500 mL, o qual teve o seu volume completado com água destilada. A solução foi

armazenada para análises posteriores de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, hidroximetil furfural (HMF) e lignina solúvel.

3.2.5.2. Determinação de lignina insolúvel na fração sólida

O material retido no papel de filtro foi lavado com 1500 mL de água destilada, transferido para pesa-filtros para secagem em estufa a 100 °C até massa constante. A percentagem de lignina insolúvel foi calculada em relação à massa de amostra seca (Equação 2).

$$\%L_K = \left(\frac{M_K - M_C}{M_A} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

onde:

- L_K Lignina Klason insolúvel;
- M_K Massa de lignina insolúvel seca;
- M_C Massa de cinzas;
- M_A Massa da amostra seca.

3.2.5.3. Determinação de lignina solúvel na fração líquida

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000). O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a equação 3.

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

onde:

- C_{lig} concentração de lignina solúvel, em g/L;
- A_T absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm;
- $A_{pd} = (c_1 \epsilon_1 + c_2 \epsilon_2)$ absorbância dos produtos de degradação, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente), cujas concentrações c_1 e c_2 foram determinadas previamente por

CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e ϵ_1 e ϵ_2 são as absorvidades e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L g⁻¹ cm⁻¹.

3.2.5.4. Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e Hidroximetilfurfural na fração líquida

A fração líquida das amostras foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Nas análises de carboidratos e ácidos orgânicos foi utilizada coluna Aminex HPX87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltd) em cromatógrafo Shimadzu modelo LC-10AD, empregando um detector de índice de refração Shimadzu modelo RID-6A. A fase móvel utilizada consistia de solução de ácido sulfúrico 5 mM. A temperatura do forno foi mantida em 45°C. A vazão do eluente foi de 0,6 mL·min⁻¹. Na determinação de furfural e hidroximetilfurfural utilizou-se coluna μ -Bondapack C-18 (5 μ m) de 125 x 4 mm (Hewlett-Packard), empregando como fase móvel solução de acetronitrila com água na proporção de 1:8 e 1% de ácido acético. A vazão empregada foi de 0,8 mL·min⁻¹. A temperatura do forno foi mantida a 25°C. Os compostos foram detectados em 276 nm por um detector UV-visível Shimadzu SPD-10.

As concentrações de carboidratos, ácidos orgânicos, hidroximetilfurfural e furfural foram quantificadas a partir de curvas de calibração de cada composto puro (padrões).

Os compostos detectados nesta análise foram:

- glicose, ácido fórmico, celobiose, hidroximetilfurfural (provenientes da fração hidrolisada de celulose).
- xilose, arabinose, ácido glucorônico, ácido acético e furfural (provenientes da fração de hemicelulose).

3.2.5.5. Determinação de cinzas

O filtro de papel utilizado na determinação da lignina insolúvel em meio ácido, junto com a amostra já seca, foi transferido para um cadinho de porcelana,

previamente tarado. A amostra foi calcinada à 300 °C por uma hora e mais duas horas a 800°C, em uma mufla (modelo 318D24, Quimis). Após resfriamento o cadinho foi pesado e a porcentagem de cinzas na amostra determinada (equação 4).

$$\% \text{cinzas} = \left(\frac{M_C}{M_A} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

onde:

% cinzas Percentual em massa de cinzas;

M_C Massa de cinzas;

M_A Massa da amostra em base seca.

3.2.6. Determinação de glicose

Nos experimentos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica a concentração de glicose foi determinada por método colorimétrico empregando *kit* enzimático (marca Doles Reagentes). Neste método, 10 microlitros da amostra foram adicionados a 1 mL da solução do *kit* enzimático. Esta solução foi submetida à 37°C em banho termostaticado por cinco minutos. A absorbância das soluções foi lida em espectrofotômetro a 510 nm.

3.2.7. Determinação de etanol e glicose

Nos experimentos de fermentação alcoólica as concentrações de glicose e etanol ao longo do processo foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Foi utilizada coluna Aminex HPX87H (300 x 7,8mm, Bio-Rad Technologies Ltd) em cromatógrafo Shimadzu modelo LC-10AD, empregando detector de índice de refração Shimadzu modelo RID-6A. Fase móvel utilizada: ácido sulfúrico 5 mM, temperatura do forno mantida a 45°C e vazão de eluente de 0,6 mL·min⁻¹.

3.3. Caracterização do bagaço (MEV)

Algumas amostras de BCA foram submetidas à caracterização estrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As análises de MEV foram realizadas no Instituto de Química de São Carlos (IQSC, USP, São Carlos, SP) em equipamento LEO (modelo 440) com detector OXFORD, operando com feixe de elétrons de 20 kV. As amostras foram recobertas com 10nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 e mantidas em dessecador até o momento de análise. Algumas análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE-DeMA, UFSCar, São Carlos, SP).

3.4. Hidrólise enzimática das amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas

Amostras de diferentes seqüências de pré-tratamento foram submetidas a experimentos de hidrólise enzimática na configuração SHF (*Separated Hydrolysis and Fermentation*) em reatores de vidro encamisados (volume útil de 100 mL), a temperatura de 50°C e sob agitação mecânica de 150 rpm.

Na etapa 1 a carga de sólidos utilizada foi de 8% (m/v). Nas etapas 2 e 3 as cargas de sólidos utilizadas foram de 10% e 12% (m/v). Na etapa 4 a carga de sólidos foi elevada para 15% e 20% (m/v). Os meios de hidrólises tinham em sua composição: bagaço pré-tratado (calculado em base seca para a carga de sólidos avaliada), extrato enzimático nas proporções avaliadas (33, 65 e 98 FPU/g-celulose) e tampão citrato de sódio (q.s.p). A Figura 18 apresenta uma fotografia do reator no qual os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados (etapas 1, 2 e 3). A Figura 19 mostra o equipamento utilizado nos experimentos de hidrólise realizados na etapa 4.



Figura 18 - Fotografia do reator utilizado nos experimentos de hidrólise enzimática na configuração SHF (*Separated Hydrolysis and Fermentation*) nas etapas 1, 2 e 3.



Figura 19 - Fotografia do reator utilizado nos experimentos de hidrólise enzimática na configuração SHF (*Separated Hydrolysis and Fermentation*) na etapa 4.

O meio reacional para os experimentos realizados na configuração SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) era composto dos mesmos

constituintes utilizado na configuração SHF e adicionando-se a ele os componentes do meio de fermentação descritos no item 3.7.

Todos experimentos de hidrólise enzimática foram realizados utilizando o extrato enzimático Accelerase 1500 da Genencor, vale observar que este extrato apresenta uma atividade celobiolítica alta, não havendo necessidade de complementação com beta-glucosidase.

3.5. Determinação de proteína

A quantificação de proteína no extrato enzimático (Accelerase 1500) e no sobrenadante do experimento de hidrólise enzimática foi efetuada de acordo com o método de Bradford (1976).

3.6. Determinação de atividade enzimática

Para a determinação da atividade enzimática no extrato fornecido pela Genencor, utilizou-se da metodologia de determinação da atividade enzimática de celulase total (GHOSE, 1987).

3.7. Fermentações

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers ou em tubos falcon mantidos a 32°C em incubadora (New Brunswick Scientific, C25KC, incubator shaker) sob agitação de 150 rpm. O meio reacional dos experimentos de fermentação era constituído por (em g/L): peptona (1,0), extrato de levedura (2,0), MgSO₄ (0,25), K₂HPO₄ (0,5), (NH)₄SO₄ (1,0) e 4 ppm de antibiótico kamoran.

A levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae* (levedura comercial na forma liofilizada, marca Fleishmann).

A Figura 20 apresenta um diagrama de blocos simplificado do procedimento experimental realizado neste trabalho.

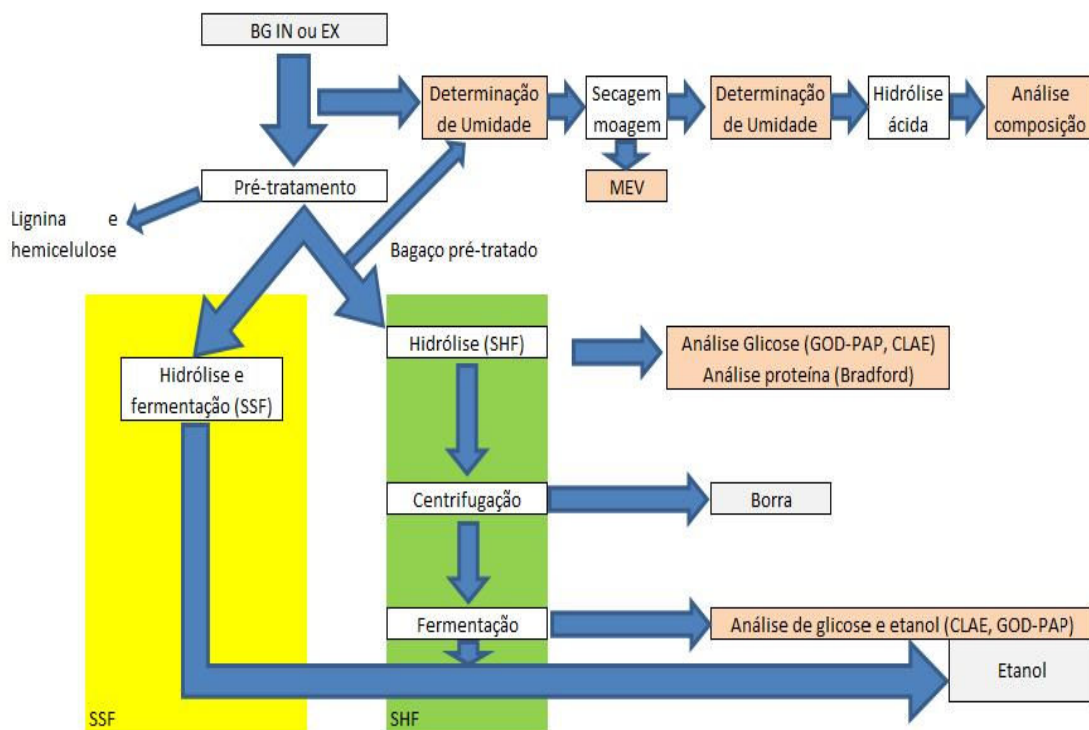


Figura 20 - Diagrama de blocos simplificado do procedimento experimental realizado neste trabalho para produção de etanol 2G em escala de bancada a partir do BCA.

As amostras de BCA (*in natura* e explodido a vapor) foram caracterizadas antes e após cada pré-tratamento realizado com relação à sua composição e suas características morfológicas.

Após a etapa de pré-tratamento o bagaço pré-tratado resultante foi empregado na etapa de hidrólise onde se acompanhou a concentração de glicose por meio de retirada de amostras em intervalos de tempo periódicos. O material resultante da hidrólise foi centrifugado o sobrenadante empregado na etapa de fermentação.

Na etapa de pré-tratamento foram utilizadas diferentes seqüência de pré-tratamento. A Figura 21 apresenta um diagrama de blocos ilustrativo dessas seqüências, bem como a nomenclatura empregada.

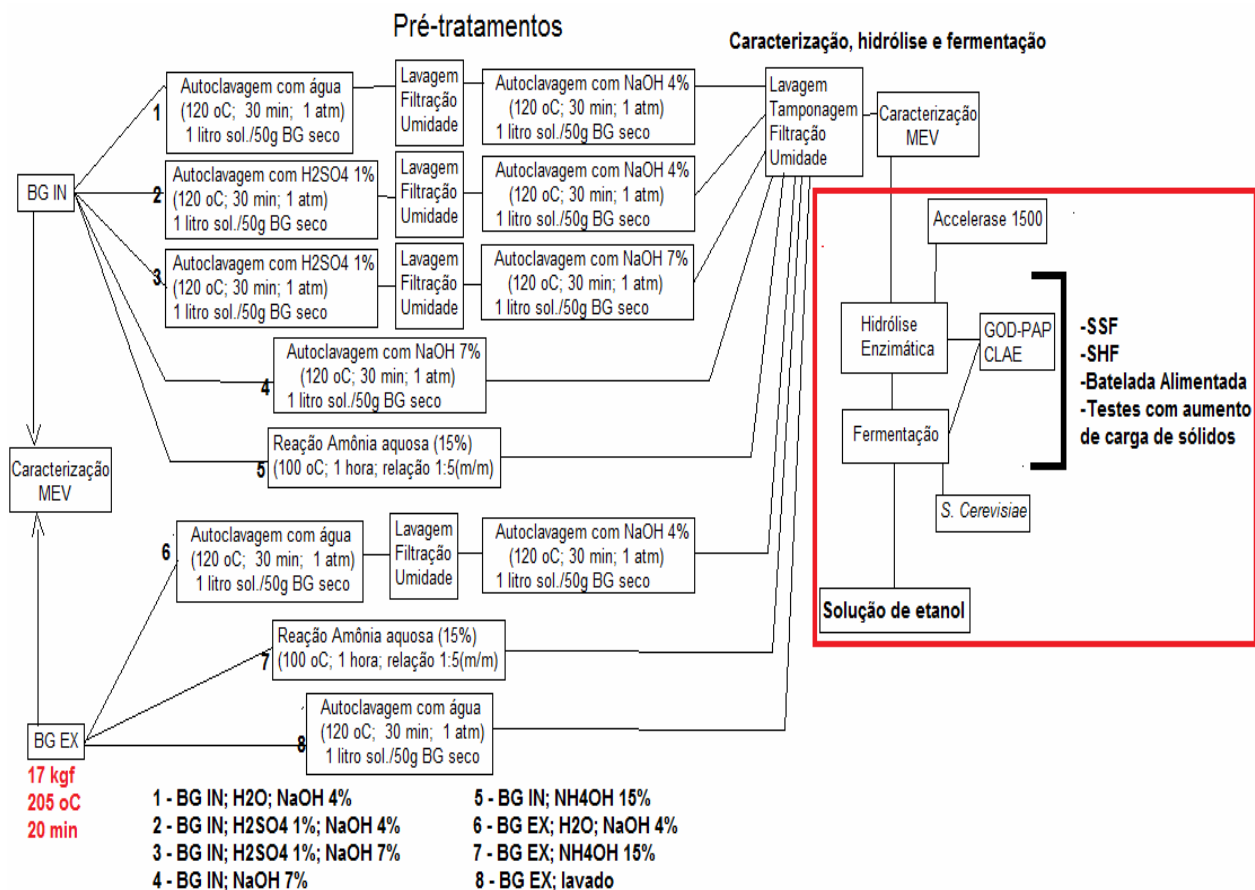


Figura 21 - Diagrama de blocos apresentando as seqüência de pré-tratamentos utilizados e respectiva nomenclatura empregada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Pré-tratamento e caracterização do bagaço (Etapa 0)

Todas as amostras de BCA foram caracterizadas antes e após cada sequência de pré-tratamento. A Tabela 2 apresenta os resultados de composição do material pré-tratado após as diferentes sequências de pré-tratamento.

Tabela 2 – Composição dos três principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina) para bagaço de cana-de-açúcar após diferentes sequências de pré-tratamentos empregadas neste trabalho e rendimento de cada sequência.

sequência de pré-tratamento	Três principais componentes na composição			Rendimento
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	
BCA	%			
IN	38,8	29,4	21,7	-
EX	41,8	29,0	34,3	-
IN: H ₂ O + NaOH 4%	68,3	17,9	10,5	0,43
IN: NH ₄ OH 15%	59,5	16,6	17,7	0,49
EX: H ₂ O + NaOH 4%	76,3	6,7	16,4	0,37
EX: NH ₄ OH 15%	76,3	6,7	15,5	0,37
IN: H ₂ SO ₄ 1% + NaOH 4%	73,0	7,0	17,0	0,35
IN: H ₂ SO ₄ 1% + NaOH 7%	75,2	13,1	12,4	0,35
IN: NaOH 7%	72,5	11,1	9,6	0,36
EX: H ₂ O	57,4	6,1	32,8	0,59

IN: Bagaço *in natura*;

EX: Bagaço explodido a vapor;

IN H₂O + NaOH 4%: Bagaço *in natura* autoclavado com água seguido de autoclavagem com solução de NaOH 4%;

IN NH₄OH 15%: Bagaço *in natura* pré-tratado com solução de hidróxido de amônio 15%;

EX H₂O + NaOH 4%: Bagaço explodido a vapor autoclavado com água seguida de autoclavagem com solução de NaOH 4%;

EX NH₄OH 15%: Bagaço explodido a vapor pré-tratado com solução de hidróxido de amônio 15%;

IN H₂SO₄ 1% + NaOH 4%: Bagaço *in natura* autoclavado com solução de H₂SO₄ seguido de autoclavagem com solução de NaOH 4%;

IN H₂SO₄ 1% + NaOH 7%: Bagaço *in natura* autoclavado com solução de H₂SO₄ seguido de autoclavagem com solução de NaOH 7%;

IN NaOH 7%: Bagaço *in natura* autoclavado com solução de NaOH 4%;

EX H₂O: Bagaço explodido autoclavado com água.

Resultados mostram que com a utilização de solução ácida na sequência de pré-tratamento é possível obter materiais com composições menores com relação a hemicelulose, já a utilização das soluções básicas (NaOH e NH_4OH) nas sequências possibilitou obter-se um material com um menor percentual de lignina ao final.

Algumas amostras foram também fotografadas e submetidas a microscopia eletrônica de varredura (MEV), Figura 22.

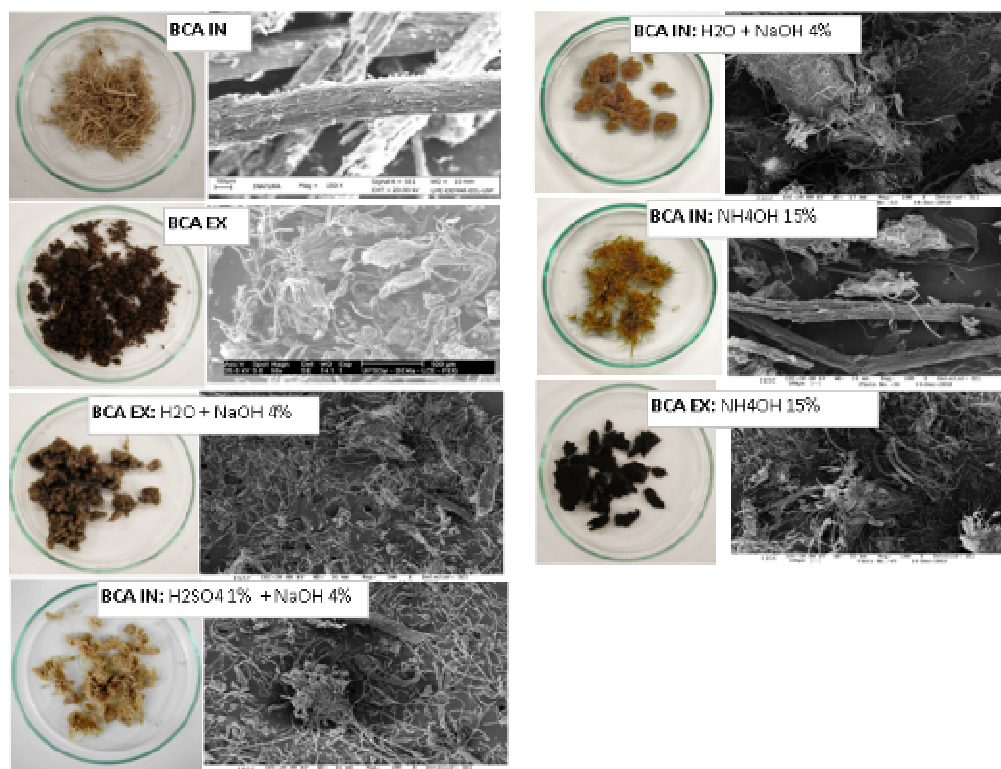


Figura 22 – Fotografias e microscopia eletrônica de varredura de diferentes bagaços pré-tratados..

As fotografias mostram que, dependendo da sequência de pré-tratamento utilizada, obtém-se um material com características visuais diferentes. Tratamento com amônia aquosa apresenta material mais fibroso e tratamento com hidróxido de sódio material mais na forma de polpa. Já a análise da microscopia eletrônica de varredura mostra uma desorganização maior para todas as amostras pré-tratadas, quando comparadas com a análise de microscopia eletrônica de varredura do material *in-natura*.

A Figura 23 apresenta a composição percentual da celulose, hemicelulose, lignina e cinzas de todas as amostras de BCA pré-tratadas.

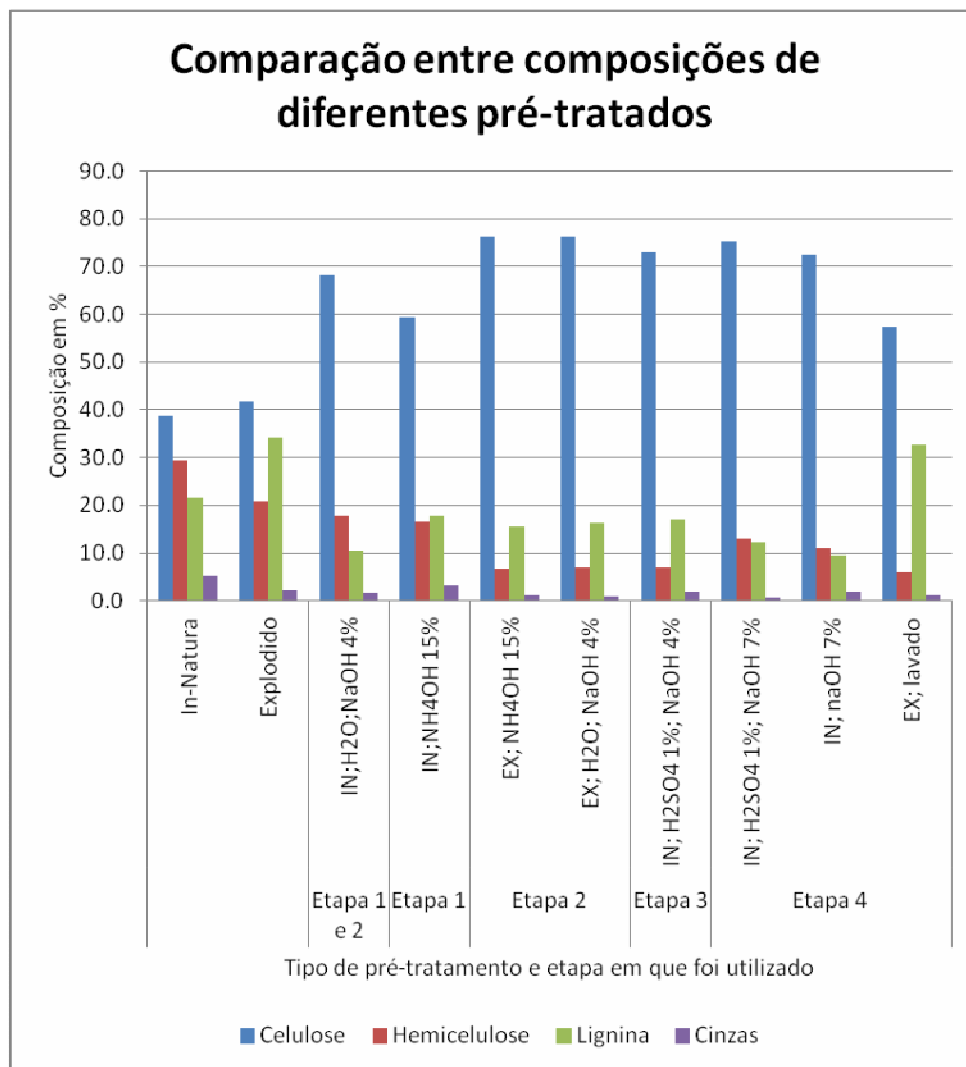


Figura 23 - Composição percentual de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas nas amostras de BCA analisadas.

Observa-se na Figura 23 que as amostras de BCA submetidas a pré-tratamento empregando solução de ácido diluído e as amostras submetidas a explosão a vapor foram as que apresentaram menor composição de hemicelulose.

Para se analisar o efeito causado pelo pré-tratamento (perda de celulose, remoção de hemicelulose e lignina) é conveniente corrigir as composições obtidas ao final do pré-tratamento com o rendimento mássico (R) obtido na correspondente etapa.

A Figura 24 apresenta os valores percentuais da perda ou remoção dos três principais componentes do BCA (celulose, hemicelulose e lignina) após cada seqüência de pré-tratamento avaliada.

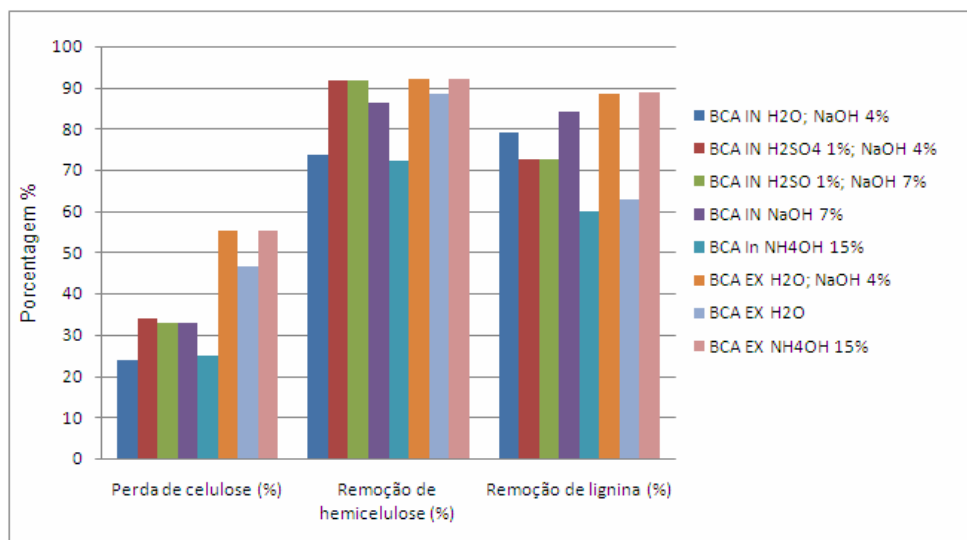


Figura 24 - Perda de celulose e remoção de hemicelulose e lignina para diferentes pré-tratamentos de bagaço de cana-de-açúcar.

A partir da Figura 24 observa-se que a menor perda de celulose (23,9%) ocorreu para o BCA *in natura* pré-tratado com água e seguida de deslignificação com solução de NaOH 4% (BCA IN: H₂O + NaOH 4%). A maior perda (55,4%) foi para as amostras de BCA explodido seguida de pré-tratamento com água e deslignificação com solução de NaOH 4% (BCA EX: H₂O + NaOH 4%) e deslignificada com solução de NH₄OH 15% m/m (BCA EX: NH₄OH 15%).

A remoção de hemicelulose foi eficiente para todas amostras de BCA (valores acima de 72,3%). As amostras de BCA *in natura* que foram submetidas ao tratamento com ácido sulfúrico diluído alcançaram valores acima de 90%. Para as amostras de BCA explodido a vapor a remoção de hemicelulose foi acima 88,6%.

A remoção de lignina para as amostras que empregaram solução de NaOH ficou entre 73 e 89%. As amostras de BCA *in natura* pré-tratada com solução de NH₄OH 15% e a amostra de BCA explodido apenas tratado com água removeram 60 e 63%, respectivamente.

4.2. Avaliação dos efeitos de diferentes cargas de enzimas na etapa de hidrólise (Etapa 1)

Amostras provenientes de duas seqüências de pré-tratamento (BCA IN: H₂O + NaOH 4% e BCA IN: NH₄OH 15%) foram utilizados nesta etapa do trabalho.

Amostras de BCA foram submetidas a experimentos de hidrólise enzimática empregando cargas de enzima de 33, 65 e 98 FPU/g-celulose para a amostra de BCA: IN H₂O + NaOH 4%.

O meio de hidrólise era constituído por: 5 gramas de bagaço pré-tratado (em base seca), 14 mL de tampão citrato de sódio e volume de extrato enzimático de acordo com o experimento realizado. O extrato enzimático apresentava atividade de 108 FPU/mL (GHOSE, 1987).

Os experimentos foram realizados a 50°C, pH 4,8, por 10 horas. Os experimentos foram realizados empregando carga de sólidos de 8%. As amostras de BCA pré-tratadas apresentavam umidade de ca. 90%.

A Figura 25 ilustra o reator empregado nos experimentos.



Figura 25 - Fotografia do reator utilizado nos experimentos de hidrólise enzimática da etapa 1 (volume do meio reacional 60 mL).

A Figura 26 apresenta os valores das conversões obtidas nestes experimentos.

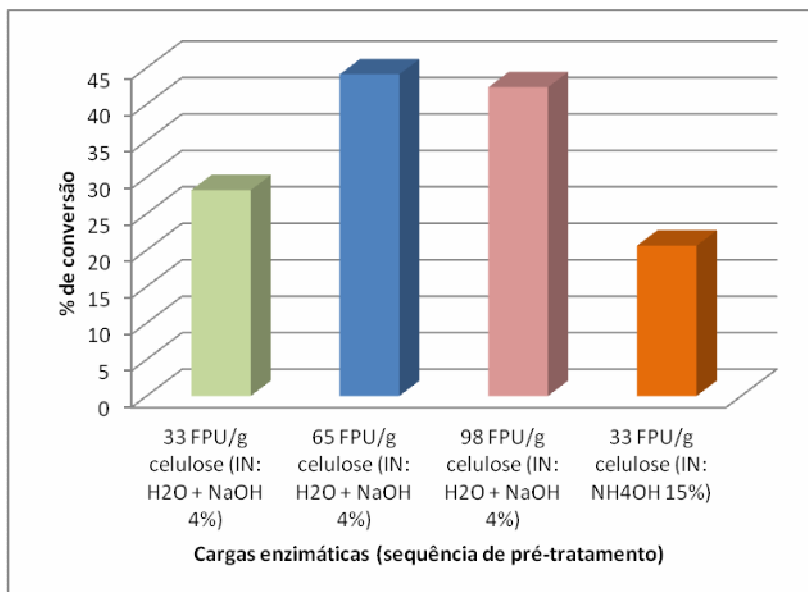


Figura 26 - Conversão enzimática da celulose em glicose em função da amostra de BCA utilizada e da carga de enzima para o tempo 10 horas.

A concentração de glicose ao longo do tempo nos experimentos de hidrólise é apresentada na Figura 27.

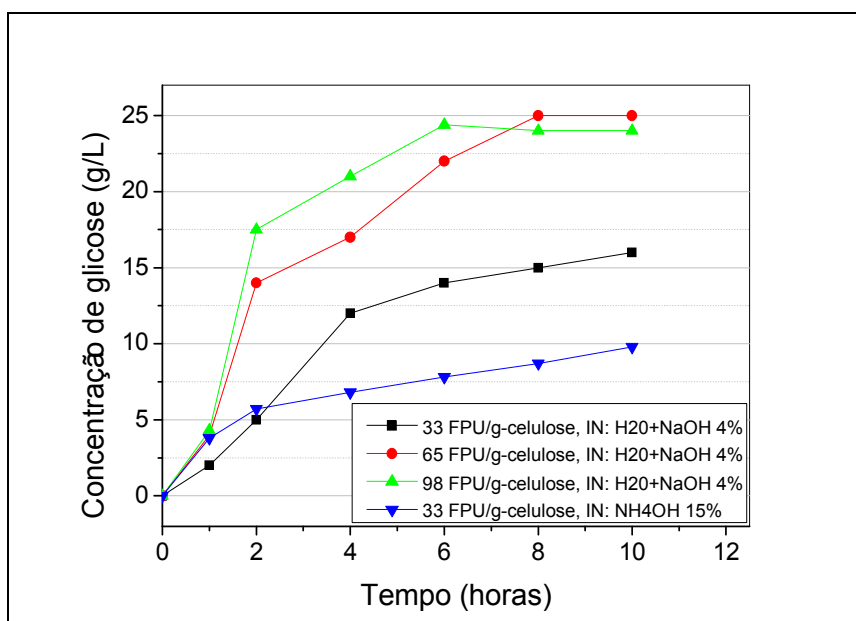


Figura 27 - Concentração de glicose em função do tempo nos experimentos de hidrólise realizados com diferentes cargas enzimáticas para as diferentes amostras de BCA pré-tratadas.

A partir dos valores experimentais de conversão apresentados na Figura 27 observa-se que não houve significativa diferença entre as cargas de enzima de 65 e 98 FPU/g-celulose, para amostra de BCA *in natura* pré-tratada com H₂O e NaOH 4%. Dessa forma, optou-se por empregar nos demais experimentos 65 FPU/g-celulose.

A conversão em glicose obtida para a amostra de BCA *in natura* tratada com hidróxido de amônio foi de 21% (33 FPU/g-celulose).

Comparando-se os experimentos de hidrólise realizados com as duas amostras de BCA provenientes de pré-tratamento empregando hidróxido de amônio e hidróxido de sódio (Figura 27) observa-se que a maior conversão obtida foi para a amostra tratada com NaOH. Analisando-se a composição dessas amostras, nota-se que o pré-tratamento empregando NaOH obteve uma maior deslignificação (79% contra 60% do pré-tratamento empregando NH₄OH). Esse fato poderia justificar o maior rendimento na hidrólise desta amostra, uma vez que a remoção de hemicelulose foi praticamente a mesma para as duas amostras (da ordem de 72%).

4.3. Avaliação da influência de diferentes pré-tratamentos no processo de hidrólise (Etapa 2)

Nestes experimentos o objetivo foi avaliar as diferentes seqüências de pré-tratamento das amostras de BCA.

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados empregando carga de enzima de 65 FPU/g-celulose e 10% de carga de sólidos.

As amostras avaliadas foram: BCA IN: H₂O + NaOH 4%; BCA EX H₂O + NaOH 4% e BCA EX NH₄OH 15%.

A Figura 28 apresenta uma fotografia ilustrando o aparato experimental na realização dos três experimentos.



Figura 28 - Fotografia dos experimentos de hidrólise enzimática empregando diferentes materiais pré-tratados.

Vale ressaltar que nestes experimentos a umidade das amostras de BCA pré-tratadas foi reduzida para 10% de umidade (secada em estufa a 40°C). Posteriormente as amostras foram cominuídas (granulometria não determinada).

As conversões obtidas no tempo de hidrólise de 8 horas são apresentadas no gráfico da Figura 29.

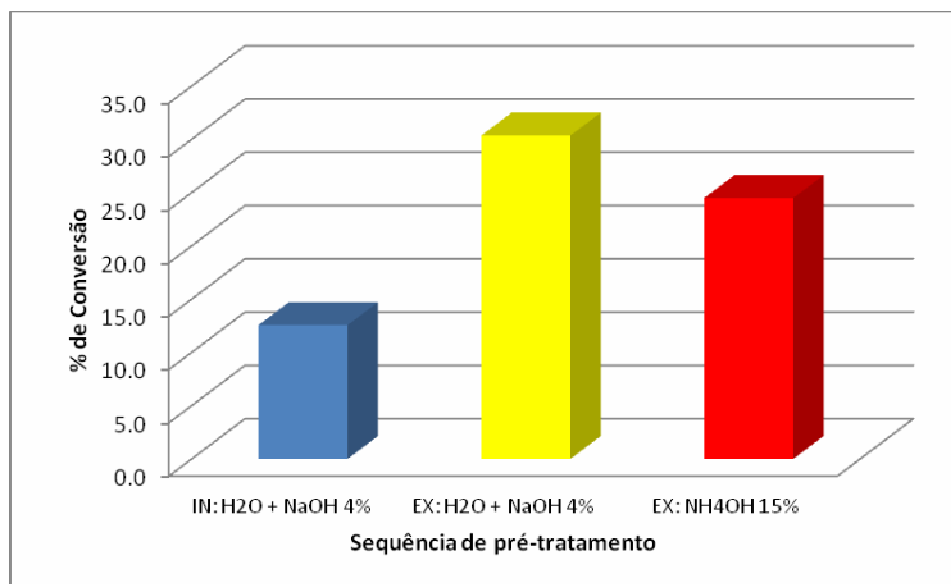


Figura 29 - Conversão de celulose a glicose nos experimentos de hidrólise enzimática.

A maior conversão (da ordem de 30%) foi obtida para a amostra de BCA explodido a vapor pré-tratada com água seguida de deslignificação alcalina.

Avaliação da influência da umidade do material a ser hidrolisado com relação ao rendimento nesta etapa

Devido aos baixos rendimentos de hidrólise alcançados nesta etapa, avaliou-se a influência da secagem do bagaço na conversão enzimática (experimentos realizados com carga de sólidos de 10% e carga enzimática de 65 FPU/g-celulose).

Amostras de BCA IN e EX pré-tratadas com água e NaOH 4% foram empregadas em experimentos de hidrólise com umidades de 10% e 70%. As conversões para as diferentes amostras obtidas nestes ensaios são mostradas na Figura 30.

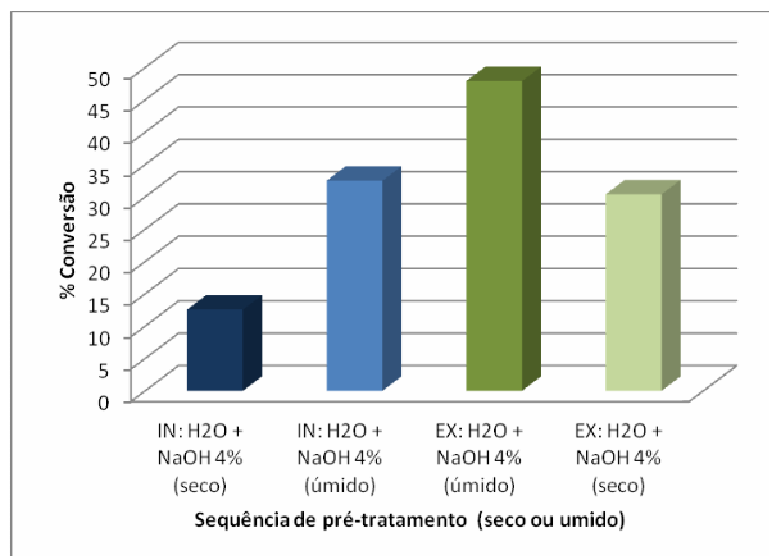


Figura 30 - Conversão de celulose a glicose nos experimentos de hidrólise empregando amostras de BCA IN e EX (seco e úmido) em 8 horas de experimento.

A partir dos resultados obtidos (Figura 32), fica evidente que a secagem da amostra antes da etapa hidrólise prejudica a eficiência do processo de hidrólise (vide

Figura 26, experimento realizado com amostra de BCA IN: H₂O + NaOH 4% com 90% de umidade).

4.4. Testes nas configurações SHF (*Separated hydrolysis and fermentation*), SSF (*Simultaneous saccharification and fermentation*) e Batelada alimentada (Etapa 3)

O experimento realizado na configuração SHF empregou amostra de BCA *in natura* submetida a pré-tratamento com ácido diluído antes da etapa de designificação com solução de NaOH (BCA IN: H₂SO₄ 1% + NaOH 4%). As condições empregada neste experimento foram: carga de sólidos de 10%; carga de enzimas de 65 FPU/g-celulose; umidade da amostra de 90%, temperatura 50 °C e pH 4,8.

O resultado da concentração de glicose ao longo do tempo neste experimento é apresentado na Figura 31. Nesta figura, para fins de comparação, apresenta-se também a concentração de glicose nos experimentos empregando amostras de BCA *in natura* (com 90% e 10% de umidade, etapas 1 e 2). Observa-se que a umidade e o pré-tratamento com solução de ácido influenciaram no rendimento da hidrólise.

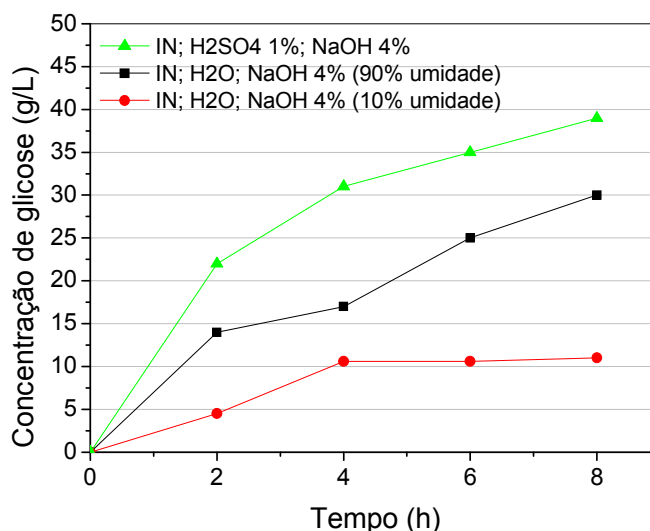


Figura 31 - Concentração de glicose ao longo dos experimentos de hidrólise enzimática empregando BCA *in natura* submetidos a diferentes pré-tratamentos.

O pré-tratamento com solução de ácido (etapa 3) aumentou a remoção de hemicelulose para 91,6%. Para as amostras onde não se utilizou a autoclavagem com ácido, a remoção de hemicelulose foi de 73,7%. Este fato, juntamente com a umidade, podem justificar o incremento na conversão de celulose a glicose.

O gráfico apresentado na Figura 32 apresenta a conversão obtida durante as etapas 1, 2 e 3 deste trabalho (conversões calculadas em 35 horas). Em todos experimentos a carga de sólidos empregada foi de 10%.

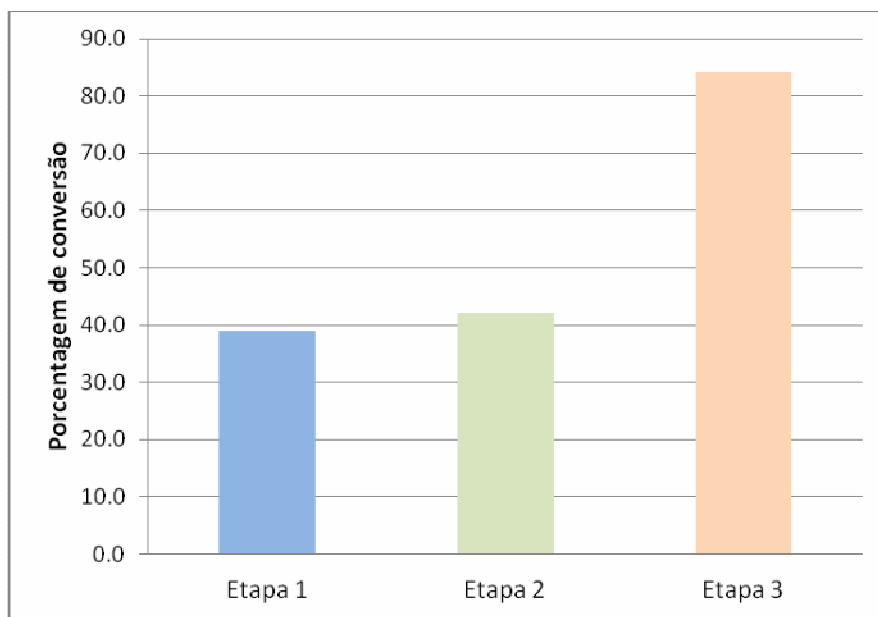


Figura 32 - Gráfico da conversão enzimática de celulose a glicose (em 35 horas) nos experimentos empregando carga de enzima de 65 FPU/g-celulose nas etapas 1, 2 e 3.

A etapa 3 foi a que obteve melhor resultado comparado as etapas anteriores, já que nas etapas 1 e 2 o processo de hidrólise se estabilizava em torno de 10 horas de hidrólise com baixo valor de conversão. Nestes experimentos a conversão permaneceu constante de 8 até 35 horas (dados não apresentados).

A Figura 33 apresenta o gráfico da concentração de glicose e da conversão enzimática do BCA IN H₂SO₄ 1% + NaOH 4%.

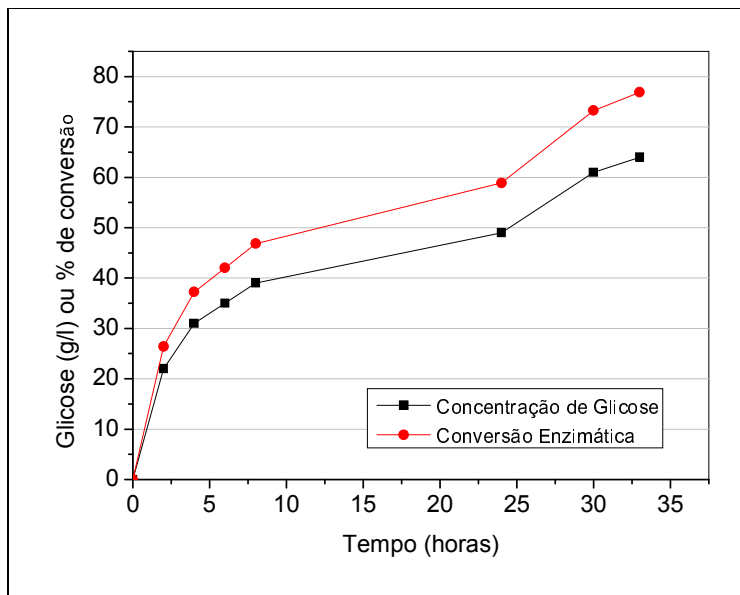


Figura 33 - Concentração de glicose e conversão ao longo do experimento de hidrólise do BCA IN: H₂SO₄ 1% + NaOH 4% (etapa 3).

A concentração de glicose na etapa 3 atingiu cerca de 59% de conversão em 24 horas de hidrólise, e 77% em 33 horas de hidrólise (64 g/L).

Comparação entre configurações SHF (Separated Hydrolysis and Fermentation) e SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation)

Foram realizados nesta etapa dois experimentos na configuração SHF e três experimentos na configuração SSF.

As fermentações SHF foram realizadas com os materiais hidrolisados da etapa 2 e da etapa 3, os quais inicialmente continham 32 g/L e 53 g/L, respectivamente, de glicose.

Os resultados obtidos nestes dois experimentos são ilustrados nas Figuras 34 e 35.

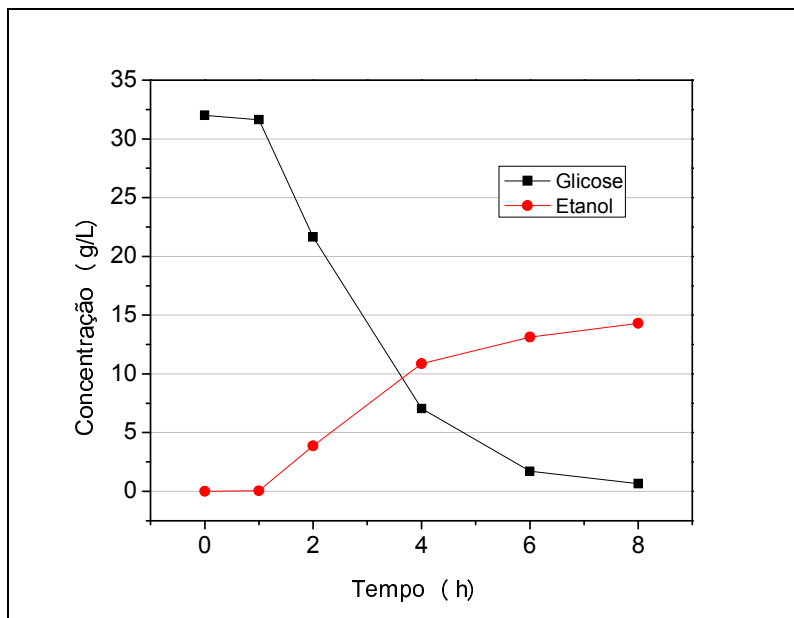


Figura 34 - Concentração de glicose e etanol ao longo do experimento empregando hidrolisado proveniente da etapa 2.

A primeira fermentação realizada de forma consecutiva (SHF) iniciou com um volume de 14 mL com concentração de 32 g/L em glicose e atingiu uma concentração final de etanol igual a 14,3 g/L após 8 horas de fermentação.

No segundo experimento realizado também de forma consecutiva, foi fermentado 20 mL de uma solução com concentração de 59 g/L em glicose, atingindo ao final do processo uma concentração de 26 g/L.

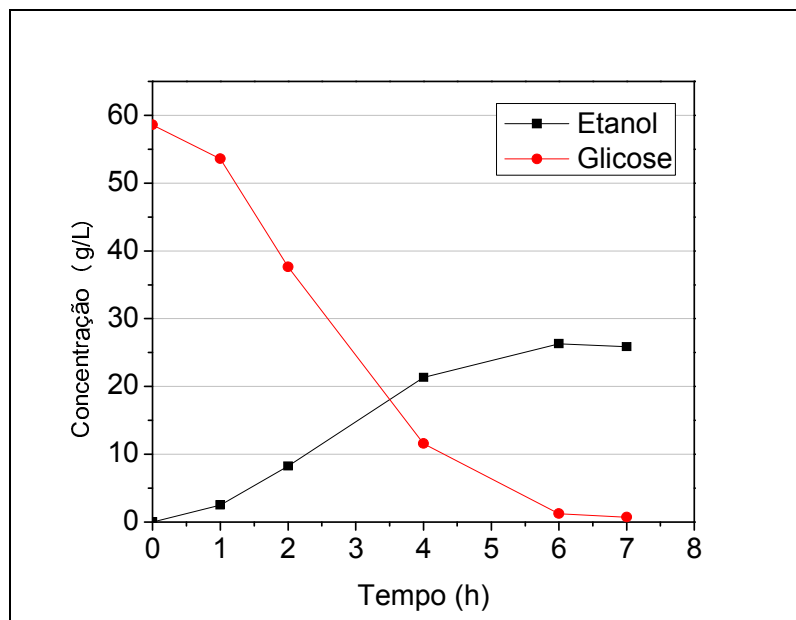


Figura 35 - Concentração de glicose e etanol ao longo do experimento empregando hidrolisado proveniente da etapa 3.

O rendimento da fermentação obtido nestes experimentos foi de 87%.

Foi também realizado nesta etapa um experimento na configuração SSF, onde hidrólise e fermentação são conduzidas juntas. No primeiro experimento, o fermento foi adicionado ao meio de hidrólise após duas horas do início do ensaio, onde o meio continha cerca de 23 g/L de glicose.

O bagaço utilizado neste ensaio foi o *in natura* pré tratado com ácido sulfúrico 1% e NaOH 4% (BCA IN: H₂SO₄ 1% + NaOH 4%) e como observado na hidrólise separada atingiu em 33 horas 64 g/L de glicose.

A primeira parte do experimento foi conduzida a 50°C e após 2 horas mantido a 38°C, quando foi adicionada a levedura (Figura 36).

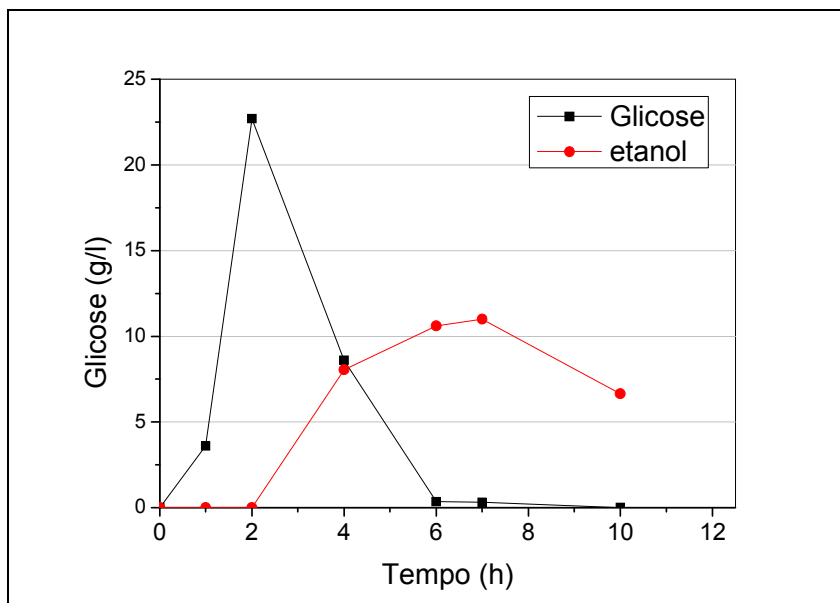


Figura 36 - Gráfico da concentração de glicose e etanol no experimento realizado na configuração SSF (hidrólise e fermentação simultâneas).

Neste experimento observa-se que a redução da temperatura (50 para 38 °C) após 2 horas de experimento reduziu consideravelmente a velocidade de hidrólise. A velocidade de consumo de glicose pelas leveduras (que foram inoculadas em 2 horas) foi maior que a velocidade de hidrólise. Este fato fez com que a partir de 7 horas a levedura iniciasse o consumo do etanol presente no meio reacional.

Foram realizados dois ensaios nesta configuração. Contudo, nestes ensaios a inoculação ocorreu após 6 horas do início da hidrólise e a temperatura foi reduzida para 32°C (Figura 37). Este experimento foi realizado em triplicata.

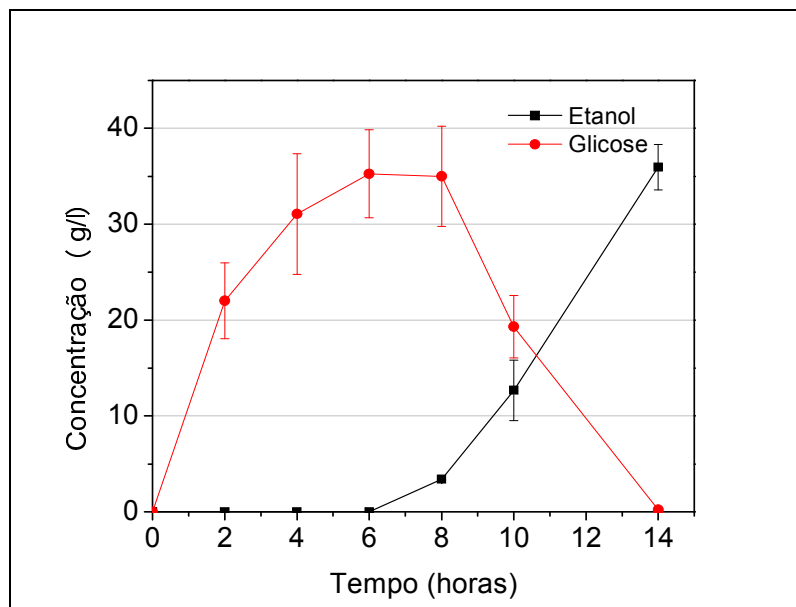


Figura 37 - Concentração de glicose e etanol no experimento realizado na configuração SSF empregando amostra de BCA IN: H₂SO₄ 1% + NaOH 4%.

Com a inoculação no tempo de 6 horas obteve-se um melhor resultado. Nos dois experimentos alcançou-se rendimento de conversão de celulose a etanol médio de 86,5%. O rendimento de celulose a etanol é calculado pela equação (5), SANTOS et al. (2010).

$$ECC = \left(\frac{C_{\text{etanol final}}}{C_{\text{celulose inicial}} \cdot 0,57} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

onde:

ECC Eficiência de conversão de celulose a etanol;

$C_{\text{etanol final}}$ Concentração de etanol ao final do experimento;

$C_{\text{celulose inicial}}$ Concentração de celulose presente na amostra de BCA;

0,57 Fator de conversão de celulose a etanol.

Neste experimento houve uma considerável redução no tempo de processamento do material (aproximadamente 14h). No experimento na

configuração SHF o tempo total (hidrólise e fermentação foi de 37 horas), com ECC de 63,2%.

A análise de viabilidade celular realizada em amostras retiradas ao longo do cultivo (8 e 15 horas) indicou 100% de viabilidade.

Experimento na forma de batelada alimentada

Com o objetivo de aumentar a carga de sólidos na etapa de hidrólise, realizou-se experimento operado em batelada alimentada (alimentação de BCA pré-tratado ao longo do tempo).

Nestes experimentos a carga inicial de sólidos empregada foi de 10% (volume de 25 ml de meio reacional). Ao longo da hidrólise bagaço pré-tratado foi alimentado ao reator à vazão de 0,25 g (em base seca) a cada 30 minutos. O início da alimentação ocorreu após 30 minutos do início do experimento.

Ao final da alimentação o experimento atingiu 12,2% de carga de sólidos. Esse pequeno aumento na carga de sólidos deve-se ao fato do bagaço pré-tratado alimentado conter 80% de umidade. Ou seja, cada adição de bagaço pré-tratado (em base seca) continha grande massa de água. A Figura 38 ilustra a concentração de glicose obtida nos ensaios em batelada e em batelada alimentada.

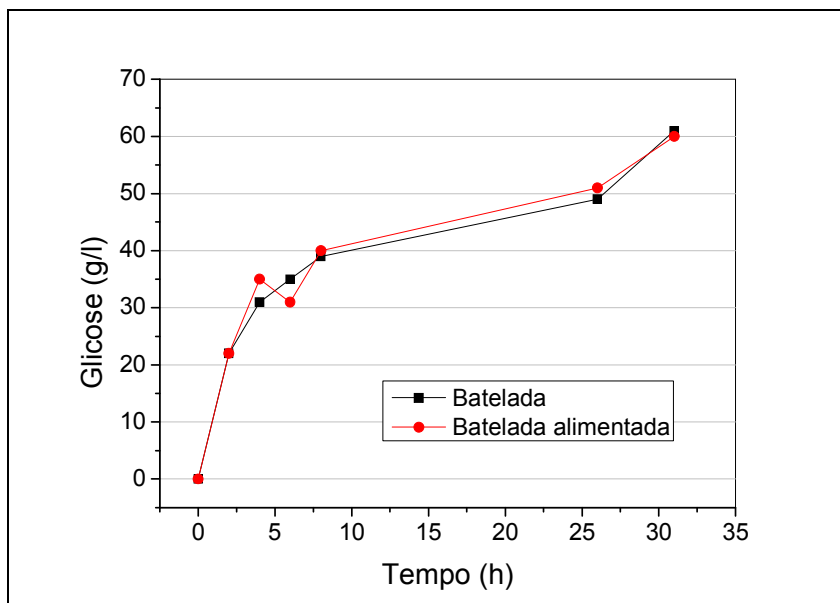


Figura 38 - Concentração de glicose nos ensaios realizados em batelada e batelada alimentada durante experimentos de hidrólise enzimática.

Observa-se a partir da Figura 38 que praticamente não houve diferença na concentração de glicose ao longo do tempo nos dois experimentos. Esse fato é justificado pela diluição que ocorre no processo em batelada alimentada (adição de bagaço pré-tratado com 80% de umidade).

A conversão de celulose a glicose alcançada em 30 horas para o experimento em batelada foi maior que para o experimento em batelada alimentada (Figura 39). Ressalta-se aqui que a mesma carga de enzima (65 FPU/g-celulose, no início dos experimentos) foi empregada em ambos os experimentos.

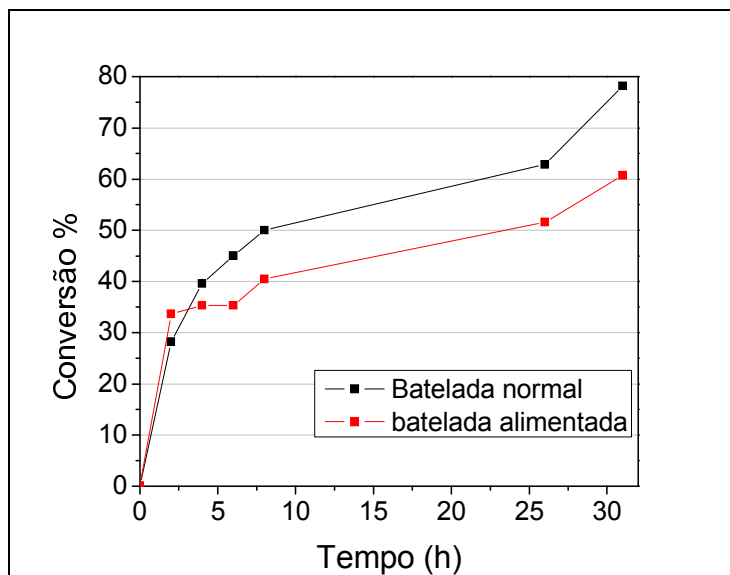


Figura 39 - Conversão em função do tempo para os experimentos em batelada e batelada alimentada.

Para o experimento operado em batelada alimentada a conversão foi calculada levando-se em conta a massa de bagaço pré-tratado existente no meio reacional em cada tempo

A Figura 40 apresenta gráfico da massa de glicose ao longo do tempo nos dois experimentos de hidrólise.

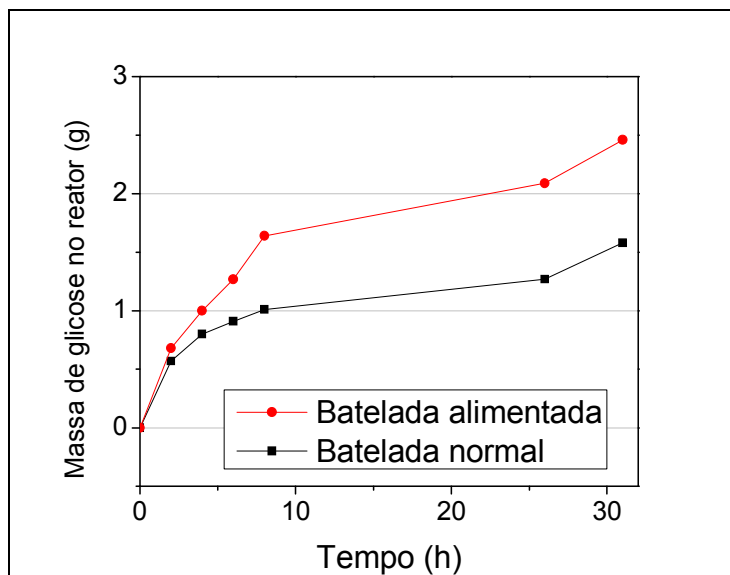


Figura 40 - Massa de glicose em função do tempo em batelada e batelada alimentada.

Como a carga de enzima utilizada nos dois experimentos foi a mesma e no experimento em batelada alimentada a massa de glicose ao final do experimento foi maior, podemos dizer que este experimento mostrou-se mais eficiente em termos da quantidade de enzima utilizada. A mesma quantidade de enzima produziu aproximadamente 55,7% a mais de glicose no mesmo tempo.

4.5. Aumento de escala e de carga de sólidos nos experimentos de hidrólise enzimática (Etapa 4)

Os experimentos realizados nessa etapa tiveram o objetivo de avaliar preliminarmente os gargalos das etapas de pré-tratamento, hidrólise e fermentação quando realizados em maior escala (ampliação de escala de 20 vezes; experimentos de hidrólise enzimática 1 litro).

O pré-tratamento da matéria-prima, BCA, foi realizado conforme já descrito no item 4.2.1 do procedimento experimental (pré-tratamento com ácido diluído seguido de deslignificação com NaOH). Duas etapas de lavagem foram necessárias. A

quantidade de água utilizada nestas lavagens foi contabilizada. A Figura 41 apresenta o diagrama de blocos das etapas de pré-tratamento.

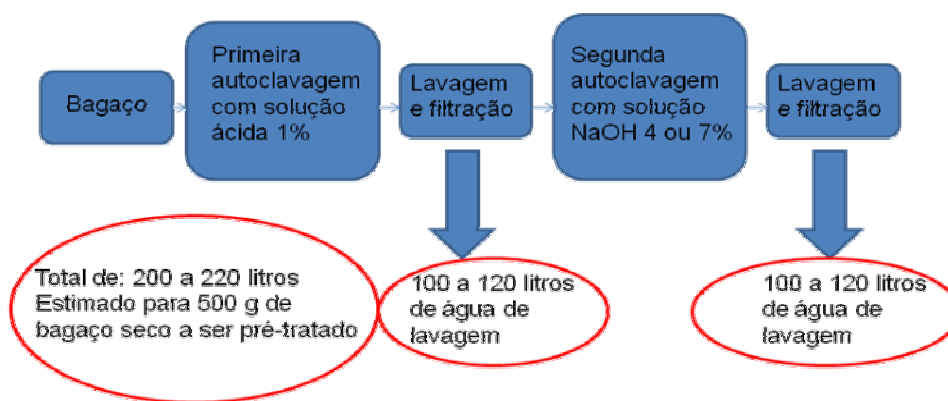


Figura 41 - Diagrama de blocos do processo de pré-tratamento do BCA e estimativa com volume de água utilizado em cada etapa.

Os valores estimados na lavagem (da ordem de 400 a 440 litros por quilograma de bagaço em base seca) são elevados, vale lembrar que o critério adotado neste trabalho para lavagem foi o de se atingir o pH neutro após cada etapa de pré-tratamento.. Necessita-se, porém, realizar estudo mais aprofundado neste aspecto com o objetivo de minimizar o gasto com água (estudo de neutralização da polpa, reuso de água de lavagem, etc.), pois o uso de água pode vir a ser um gargalo no processo industrial.

Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados empregando cargas de sólido de 8%, 10%, 15% e 20%. A concentração de glicose foi acompanhada ao longo dos experimentos empregando método enzimático colorimétrico (GOD-PAP).

A Figura 42 apresenta as concentrações de glicose obtidas nos seis experimentos de hidrólise realizados empregando bagaço pré-tratado provenientes de diferentes seqüências de pré-tratamento e diferentes cargas de sólidos.

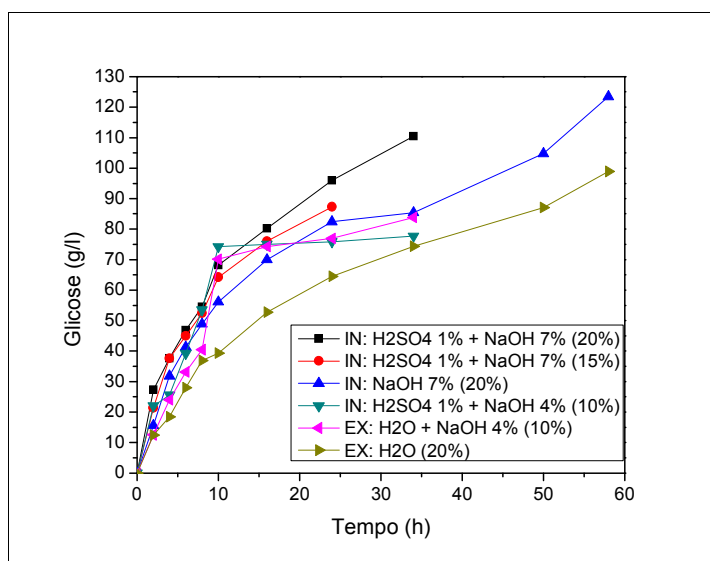


Figura 42 - Concentração de glicose variando com tempo para hidrólise com diferentes cargas de sólidos.

A Figura 43 ilustra gráfico com os valores conversão ao longo do tempo, onde se pode observar o efeito do aumento da carga de sólidos (10%, 15% e 20%) para os experimentos realizados com o BCA proveniente da mesma seqüência de pré-tratamento (BCA IN H2SO4 1%; NaOH 4%; e BCA IN H2SO4 1%; NaOH 7%).

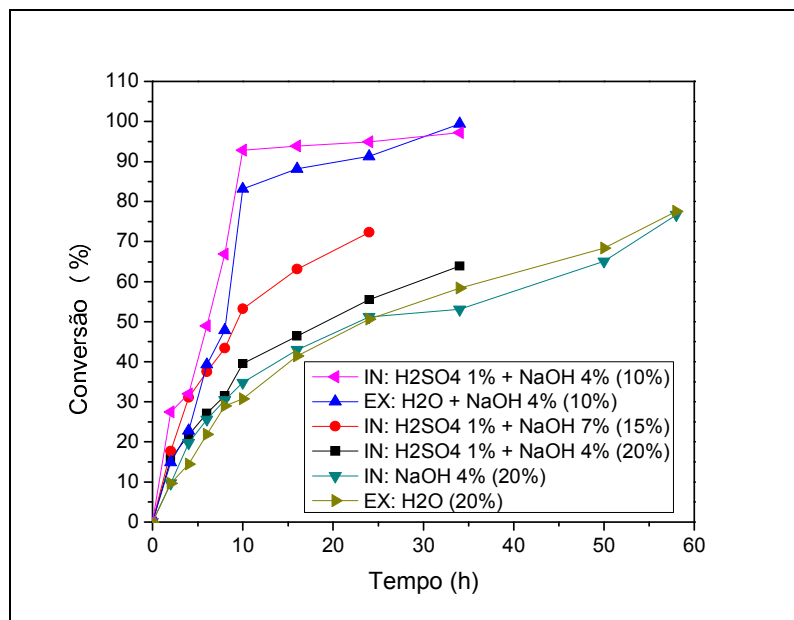


Figura 43 - Conversão da etapa de hidrólise para diferentes cargas de sólidos.

A Tabela 3 mostra os valores de concentração de glicose, conversão e produtividade obtidos nos experimentos de hidrólise enzimática empregando diferentes materiais pré-tratados, em diferentes cargas de sólidos (10%, 15% e 20%) com carga enzimática de 65 FPU para o tempo de 24 horas.

Tabela 3 – Concentração de glicose, conversão e produtividade obtidos nos experimentos de hidrólise enzimática com diferentes pré-tratados e carga de sólidos.

Tempo = 24 horas / Carga enzimática = 65 FPU/g de celulose			
Sequência de pré-tratamento	Concentração de glicose (g/L)	Conversão (%)	Produtividade (g/L.h)
IN: H2SO4 1% + NaOH 7% (20%)	96	55.5	4.0
IN: H2SO4 1% + NaOH 7% (15%)	87.3	72.3	3.6
EX: H2O + NaOH 4% (10%)	82.4	91.3	3.4
IN: NaOH 7% (20%)	75.9	51.2	3.2
IN: H2SO4 1% + NaOH 4% (10%)	76.9	94.9	3.2
EX: H2O (20%)	64.5	50.6	2.7

A maior produtividade (4 g/L.h) para o tempo de hidrólise de 24 horas foi obtida para o bagaço *In-natura* pré-tratado com solução de ácido sulfúrico 1% e deslignificado com solução de NaOH 7%

A Figura 44 apresenta gráfico comparando os experimentos de hidrólise enzimática realizados com cargas de sólidos de 15 e 20%.

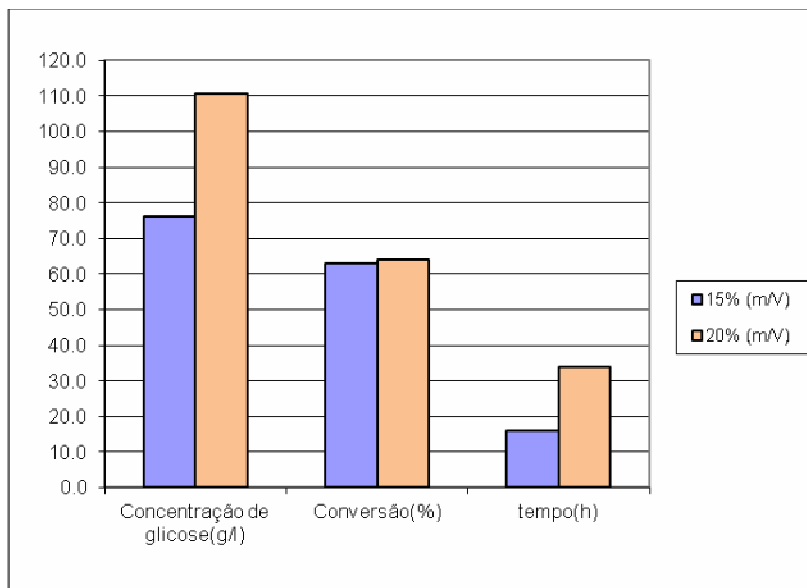


Figura 44 - Comparação entre os experimentos de hidrólise enzimática realizados com carga de sólidos de 15% e 20% (BCA IN: H₂SO₄ 1% + NaOH 7%).

A partir do gráfico da Figura 44 observa-se que para conversões da mesma ordem de grandeza (63%) tem-se para os experimentos com cargas de sólidos de 15 e 20%, respectivamente: 76,0 (em 34 horas) e 110,5 g/L (em 16 horas) de glicose. Ou seja, apesar de a conversão ser a mesma, em um menor tempo o hidrolisado com cargas de sólidos mais alta (20%) atinge maiores concentrações em glicose. Essa maior concentração em glicose pode ser interessante ao se analisar o processo quanto ao gasto de energia para concentração do hidrolisado por exemplo.

A Figura 45 mostra seqüência de fotografias tiradas ao longo de experimento de hidrólise enzimática (carga de sólidos de 20%; BCA IN H₂SO₄ 1%; NaOH 4%).

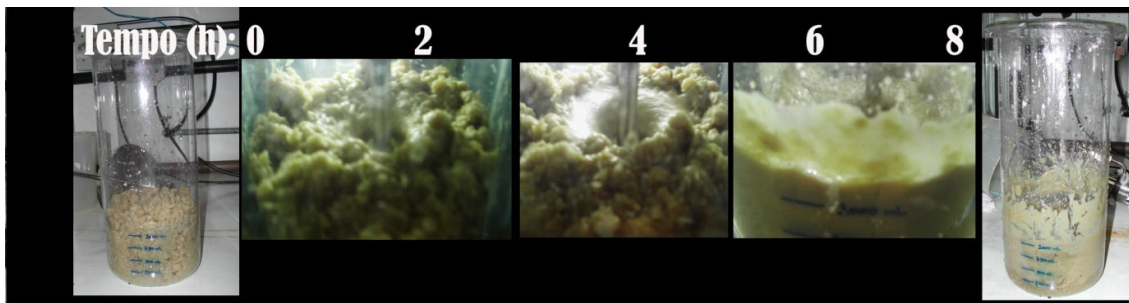


Figura 45 - Sequência de fotografias ao longo de experimento de hidrólise enzimática (20% de carga de sólidos).

Observa-se que no início do processo tem-se um meio praticamente em estado sólido. Passadas algumas horas, devido à ação das enzimas, o meio começa a se liquefazer, o que melhora a mistura. Ao final tem-se um meio líquido.

No ensaio realizado com 20% de carga de sólidos mediu-se a concentração de proteína no início (2,6 g/L) e no final da hidrólise (1,0 g/L) no meio líquido. Dessa forma obteve-se por diferença a quantidade de proteína que poderia estar adsorvida na borra residual (final do experimento), 1,6 g/L.

Os dados experimentais indicam que mais da metade da proteína adicionada no início do experimento (61%) desapareceu da fase líquida. Esta proteína pode estar adsorvida na borra. Estudos realizados por Yang e Wyman (2006) mostraram um aumento do rendimento na etapa de sacarificação pela adição de uma “proteína de sacrifício” ao meio reacional (antes da adição das celulasas). De acordo com estes autores, esta proteína se ligaria preferencialmente à superfície da lignina formando um revestimento.

Outro problema encontrado neste processo está relacionado com a agitação no início do experimento. No início do experimento tem-se muita dificuldade na mistura do material.

Ao término da hidrólise precedeu-se a centrifugação do material. A fase líquida (que continha o hidrolisado) foi utilizada nos experimentos de fermentação alcoólica. Os gráficos das Figuras 46 a 50 apresentam as concentrações de glicose e etanol ao longo dos experimentos.

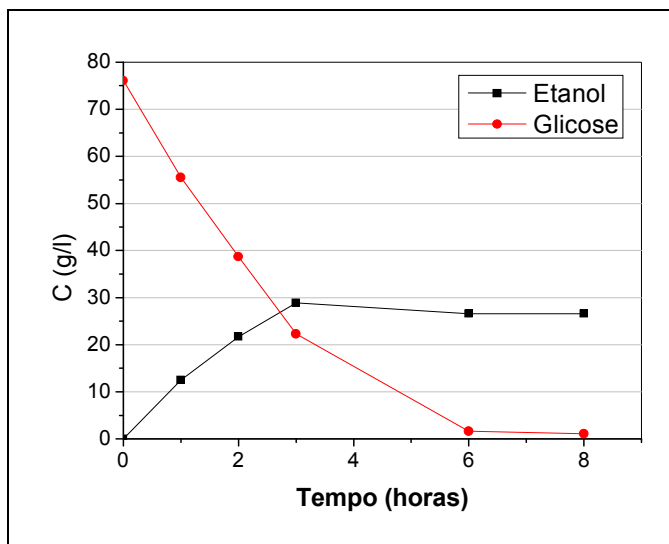


Figura 46 - Concentração de glicose e etanol na fermentação do hidrolisado proveniente do BCA IN: H₂SO₄ 1% + NaOH 7% (carga de sólidos empregada no experimento de hidrólise: 15%).

A eficiência obtida nesta fermentação foi de 88%.

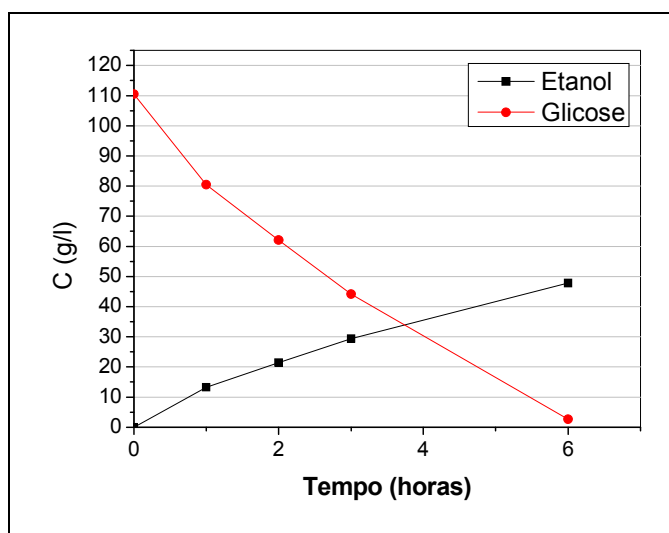


Figura 47 - Concentração de glicose e etanol na fermentação do hidrolisado proveniente do BCA IN: H₂SO₄ 1% + NaOH (carga de sólidos empregada no experimento de hidrólise: 20%)

Neste ensaio a eficiência da fermentação foi de 94%.

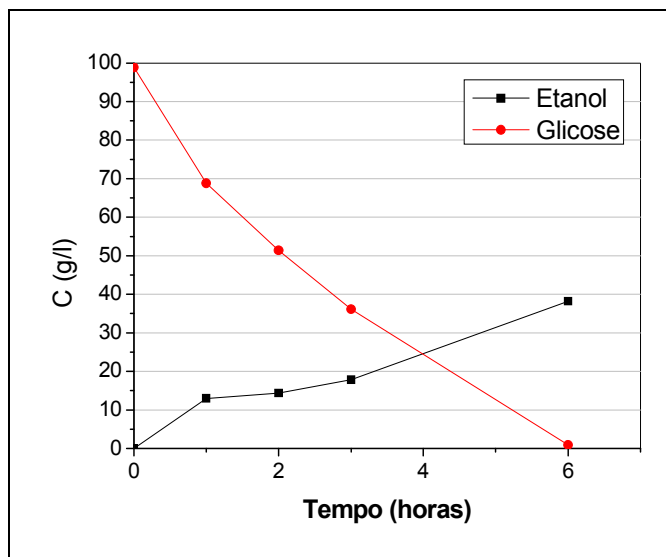


Figura 48 - Concentração de glicose e etanol na fermentação do hidrolisado proveniente do BCA EX: H₂O) (carga de sólidos empregada no experimento de hidrólise: 20%)

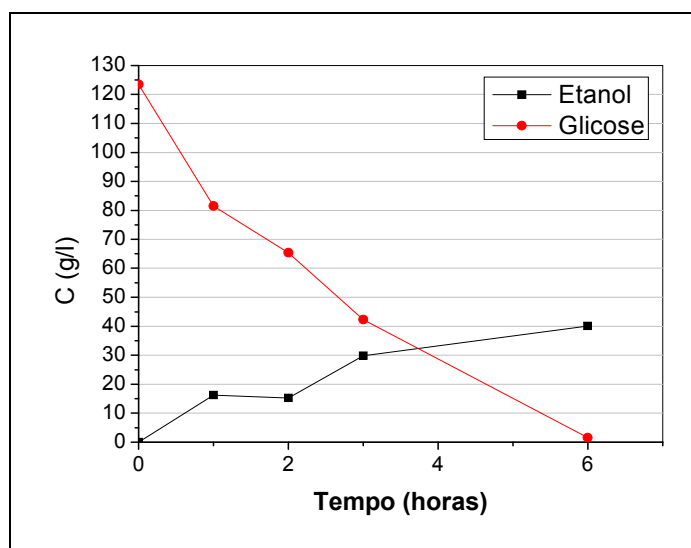


Figura 49 - Concentração de glicose e etanol na fermentação do hidrolisado proveniente do BCA IN: NaOH 7% (carga de sólidos empregada no experimento de hidrólise: 20%)

As fermentações dos hidrolisados provenientes das amostras de BCA EX lavado e BCA IN: NaOH 7% (CS=20%), provenientes dos experimentos de hidrólise

com cargas de sólidos de 20%, apresentaram, respectivamente, eficiências de 75% e 92%.

Ensaio de fermentação empregando hidrolisado (BCA IN: NaOH 7%) acrescido de melaço foi também realizado. Esta seria uma opção para se trabalhar com menores cargas de sólidos durante a hidrólise e se obter uma concentração de etanol final maior. Quanto maior a concentração de etanol ao final da fermentação, menores são os gastos energéticos na etapa de destilação.

Um volume de 150 mL de hidrolisado com 123,5 g/L de glicose foi acrescido com 44 mL de melaço com ART (açúcares redutores totais) de 458,2 g/L. No início da fermentação a concentração de ART foi de 199,4 g/L. Os resultados deste experimento de fermentação são mostrados na Figura 52.

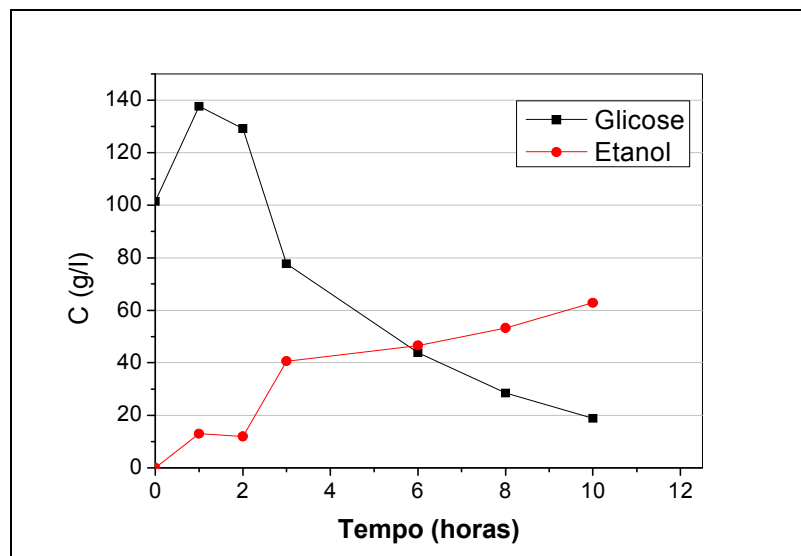


Figura 50 - Concentração de glicose e etanol ao longo do experimento de fermentação alcoólica da mistura hidrolisado e melaço.

Neste experimento a eficiência obtida na fermentação foi de 62%.

5. CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados obtidos nas oito diferentes seqüências de pré-tratamento avaliadas, conclui-se que:

- a menor de perda de celulose (23,9%) foi obtida para o BCA *in natura* autoclavado com água e deslignificado com solução de NaOH 4%;
- as maiores perdas de celulose (46,5 a 55,4%) foram encontradas para as seqüências de pré-tratamento que empregaram o BCA explodido a vapor (BCA EX:H₂O + NaOH 4%; BCA EX: H₂O; BCA EX: NH₄OH 15%);
- a remoção de hemicelulose para as amostras de BCA *in natura* pré-tratadas variou entre 72,3 e 92,2% e de lignina entre 60,0 e 88,9%;

Em relação aos experimentos de hidrólise, conclui-se que:

- a secagem (em estufa) do bagaço pré-tratado após a etapa de pré-tratamento prejudica o rendimento da hidrólise;
- a autoclavagem com solução de ácido diluído seguido da deslignificação com solução de NaOH proporcionou maior remoção de hemicelulose e maior conversão na etapa de hidrólise;
- o aumento da carga de sólidos reduz a velocidade de conversão de celulose a glicose devido a dificuldade na transferência de massa no processo (dificuldade em homogeneizar o meio reacional no início do experimento);
- os experimentos realizados com BCA com carga de sólidos de 20% apresentaram os seguintes valores de conversão ao final de 24 horas: 55,5% (BCA IN: H₂SO₄ + NaOH 7%); 51,2% (BCA: NaOH 7%); 50,6% (BCA EX: H₂O);
- o experimento realizado com BCA com carga de sólidos de 15% obteve ao final de 24 horas conversão de 72,3%;
- os experimentos realizados com BCA com carga de sólidos de 10% apresentaram os seguintes valores de conversão ao final de 24 horas: 91,3% (BCA EX: H₂O + NaOH 4%) e 94,9% (BCA IN: H₂SO₄ 1% + NaOH 4%);

- o consumo de água na etapa de pré-tratamento deve ser avaliada, uma vez que este pode ser um gargalo no processo. Alguns pré-tratamentos apesar de promissores (autoclavagem com solução ácida e deslignificação com NaOH) necessitam ainda de otimização na etapa de lavagem. O pré-tratamento com BCA explodido a vapor seguido de lavagem mostrou-se satisfatório (conversão no experimento de hidrólise com carga de 20% de sólidos: 58,4% em 34 horas).

Em relação às configurações avaliadas (SHF, SSF e Batelada Alimentada), conclui-se que:

- Os resultados alcançados na configuração SSF mostraram-se melhores que a configuração SHF. A conversão da celulose em etanol (ECC) foi de 86,5% na configuração SSF (14 horas) e de 63,2% na SHF (37 horas);
- A utilização da operação em batelada alimentada permitiu obter maior massa de glicose com a mesma quantidade de enzima utilizada no experimento em batelada e no mesmo tempo. Neste experimento o aumento da carga de sólidos foi de 10% (início do experimento) para 12,2% (final do experimento).

Em relação às fermentações dos hidrolisados, conclui-se que:

- a maioria das fermentações realizadas empregando os hidrolisados obtiveram rendimentos acima de 88%;
- a utilização de melaço para aumentar a concentração de açúcares redutores no hidrolisado pode ser uma estratégia para evitar o uso de altas cargas de sólidos (valores maiores que 10%) nos experimentos de hidrólise enzimática.

6. SUGESTÃO PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO

Na continuidade deste trabalho deve-se atentar para os seguintes pontos:

- buscar condições que reduzam a quantidade de enzima nos experimentos de hidrólise, pois esta possuem um impacto significativo no custo do processo;
- embora haja possibilidade de complementação do hidrolisado com melaço, a realização de experimento com maiores cargas de sólidos (>10%) deve ainda ser melhor avaliada. Para se obter uma melhor mistura no início da etapa de hidrólise deve-se buscar impelidores mais adequados e configurações alternativas para os reatores, por exemplo;
- avaliar o gasto com água no processo.

7. REFERÊNCIAS

ANP, Agência Nacional do petróleo, gás natural e biocombustíveis. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, gás natural e biocombustíveis, 2011.

BALAT, M.; BALAT, H.; CAHIDE, O. Progress in bioethanol processing. **Progress in energy and combustion science**, v.34, p.551- 573, 2008.

BELKACEMI, K. et al. Ethanol production from AFEX-treated forages and agricultural residues. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.72, p. 441–462, 1998.

BOTHA, T.; BLOTTNITZ, H. V. A comparison of the environmental benefits of bagasse-derived electricity and fuel ethanol on a life-cycle basis. **Energy Policy**, v. 34, p. 2654-2661, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754–4766, 2010.

CGEE, CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Bioetanol combustível: Uma oportunidade para o Brasil**. Brasília- DF,. 538 p, 2009.

CTC, CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. NOTÍCIAS. DISPONÍVEL EM: < <http://www.ctcanavieira.com.br/site/> >. Acesso em: 05/12/2009.

CERES. BIOFUELS. DISPONÍVEL EM: < <http://www.ceres.net/AboutUs/AboutUs-Biofuels.html>>. Acesso em: 09/ 09/2010.

BIOCONFÉ, CONFERENCIA NACIONAL DE BIOENERGIA.(2007, São Paulo, Brasil) **Bioenergia**. Francisco Costa (Org.). São Paulo: USP-CCS, 279 p, 2008.

FAN, L. T.; LEE, Y. H.; GHARPURAY, M. M. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 23, p. 157-187, 1983.

GALBE, M.; ZACCHI, G.; A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 618-628, 2002.

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

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M. Validação de metodologia para caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, p. 1500-1503, 2009.

HAHN-HAGERDAL, B. et al. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today, **Trends in biotechnology**, v. 24, p.549-560, 2006.

IEA, International Energy Agency, **Biofuel for transport: an international perspective**, 216 p., 2004.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JORGENSEN, H. Yield determining factors in high solids enzymatic hydrolysis of lignocellulosic. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, p.2-11, 2009.

KIM, T. H.; LEE, Y. Y. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.121-124, p. 1119–1131, 2007.

LEE, J. M.; WOODWARD, J. Properties and application of immobilized beta-glucosidase coentrapped with *Zymonas mobilis* in calcium alginate. **Biotechnology Bioengineering**. v. 15, p. 55-60, 1983.

LYND, L. R.; ELANDER, R. T.; WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 57-58, p. 741-761, 1996.

MACDONALD, D. G. et al. A. Alkali treatment of corn stover to improve sugar production by enzymatic hydrolysis. **Biotechnology Bioengineering**, v. 25, p. 2067-2076, 1983.

MACEDO; I. C. **Situação atual e perspectivas do etanol**. Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Energético da Unicamp. Estudos Avançados, 21 (59), 157-165, Campinas – SP, 2007.

MOHAGHEGHI, A. et al. Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA–integrated xylose/ arabinose fermenting strain of zymomonas mobilis AX101. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 98, p. 885–889, 2002.

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

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673–686, 2005.

NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. São Carlos: UFSCar, 2011. 126 p. Mestrado (Desenvolvimento de Processos Químicos)-UFSCAR. CCET - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia. EQ, 2011.

NGUYEN, Q. A. Economic analysis of integrating a biomass to ethanol plant into a pulp/saw mill. **Bioconversion of forest and agricultural residues**, p. 321-340, 1993.

OLIVEIRA J. G. **Perspectivas para a co-geração com bagaço de cana-de-açúcar: potencial do mercado de carbono para o setor sucroalcooleiro paulista**. São Carlos, 2007. 160 p. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós Graduação em

Engenharia de produção), Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2007.

OLSSON L.; HAHN-HAGERDAL B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial technology**, v. 18, p. 312-331, 1996.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PELLEGRINI, L. F.; **Análise e otimização termo-econômica-ambiental aplicada a produção combinada de açúcar e álcool eletricidade**. São Paulo, 2009. 350 p. Tese (doutorado), Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia Mecânica, 2009.

RABINOVICH, M. L.; MELNIK, M. S. E.; BOLOBOBA, A. V. Microbial cellulases (review). **Applied Biochemistry Microbiology**, v. 38, p. 305-321, 2002.

RAMOS, L. P. Aproveitamento Integral de resíduos agrícolas e agroindustriais. CEPESQ/UFPR RRSI, SMA/FIESP, 2000.

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

SADLLER J. N.; RAMOS, L. P.; BREUIL, C. **Steam pretreatment of lignocellulosic residues**. In: Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues (Saddler, J.N., Ed.), CAB International, Wallingford, UK, 73-91, 1993.

SÁNCHEZ. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresources Technology**, vol. 99, p. 5270–5295, 2008.

SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol por *Saccharomices cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, p. 904-908, 2010.

SILVA, G. M. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com amônia aquosa para a produção de etanol**. 2011. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2011.

SILVERSTEIN, R.; CHEN, Y. E., SHARMA-SHIVAPPA, R.; BOYETTE, M.; OSBORNE, J. **Bioresource Technology** v.98, p. 3000 - 3011, 2007.

SOTO, M. L. et al. Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower hulls. **Bioresource Technology**, v. 49, p. 53–59, 1994.

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

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

TAN, H. et al. Peroxide-acetic Acid Pretreatment To Remove Bagasse Lignin Prior to Enzymatic Hydrolysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, p. 1473-1479, 2010.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis process for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**. V. 2, p. 707-738, 2007.

TU, M.; CHANDRA, R. P.; SADDLER, J. N. Evaluating the distribution of cellulases and the recycling of free cellulases during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Biotechnology Progress**, v.23, p. 398-406, 2007.

UNICA, UNIÃO DA INDÚSTIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, UNICA. DADOS E COTAÇÕES. DISPONÍVEL EM: < <http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 05/08/2010.

YANG, B., WYMAN, C. E.; BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin contain substrates. **Biotechnology Bioengineering**, v. 94, p. 611-617, 2006.

WU, A.; LEE, Y. Y. Enhancing enzymatic saccharification of waste newsprint by surfactant addition. **Biotechnology Progress**. p.649-652, 1998.