

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

CLAUDEMIR NATALINO DA SILVA

**ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DAS
MATÉRIAS LIGNOCELULÓSICAS DA CANA-DE-
AÇÚCAR**

**BAURU
2013**

CLAUDEMIR NATALINO DA SILVA

**ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DAS
MATÉRIAS LIGNOCELULÓSICAS DA CANA-DE-
AÇÚCAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Centro de Ciências Exatas e Sociais
Aplicadas como parte dos requisitos para
obtenção do título de bacharel em Química,
sob a orientação do Prof. Dr. Raúl Andres
Martinez Uribe

BAURU
2013

Silva, Claudemir Natalino

S5862e

Etanol de segunda geração a partir das matérias lignocelulósicas da cana-de-açúcar / Claudemir Natalino da Silva -- 2013.

73f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Raúl Andres Martinez Uribe.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Etanol. 2. Biomassa. 3. Lignocelulósicas. I. Uribe, Raúl Andres Martinez. II. Título.

CLAUDEMIR NATALINO DA SILVA

**ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DAS MATÉRIAS
LIGNOCELULÓSICAS DA CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Química sob orientação do Prof. Dr. Raúl Andres Martinez Uribe

Banca examinadora:

Prof. Dr. Raúl Andres Martinez Uribe
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Me. Carlos Henrique Conte
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dra Márcia Rodrigues De Moraes Chaves
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, de dezembro de 2013.

Dedico este trabalho a toda minha família,
pelas palavras de incentivo e por todo
apoio que me foi concedido.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Áurea e Antônio, por apoiar meus estudos, e de estar ao meu lado sempre que precisei. E as minhas queridas irmãs, cunhados e sobrinhos.

Aos meus maravilhosos amigos, da Usina São Manoel como: Bruno, José Carlos, Miriam, Cristiano Azeredo, e a equipe Alfa (Eduardo, Adilson, Cátia, Claudinei, Jair e Elton). Aos tantos outros amigos não menos importantes.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Raúl Andres Martinez Uribe, pelo apoio, ensinamentos transmitidos e orientação neste trabalho.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), pelo espaço concedido e apoio no desenvolvimento deste trabalho, e especialmente aos meus colegas do CTC, Célia Galvão, Juliana Teodoro, Alexandra Pavan, Ana Paula Pitarelo, Claudia Ramos, José Augusto Tomé, Rafael, Veridiana, Nilton e outros não menos importante.

A todos que acreditaram e torcem por mim. Aos amigos distantes, familiares e professores que contribuíram de forma direta ou indireta nesta caminhada.

RESUMO

A escassez de reservas petrolíferas, principal fonte energética mundial, juntamente com as preocupações da sociedade com a preservação ambiental, tornaram o etanol uma fonte de energia sustentável de grande importância. No entanto, uma enorme gama de estudos, na área de pesquisa do etanol de segunda geração a partir das matérias lignocelulósicas da cana-de-açúcar precisa ser realizada. O objetivo geral deste trabalho foi analisar as etapas de processo como: o pré-tratamento por explosão a vapor, hidrólise enzimática e fermentação do caldo hidrolisado. O trabalho foi realizado nos laboratórios do centro de tecnologia canavieira (CTC), onde se analisaram as características do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* caracterizando-o, quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina. O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado em um reator de explosão a vapor em temperaturas em torno de 195°C por um determinado tempo de retenção. O bagaço pré-tratado foi submetido à hidrólise enzimática com uso de enzima comercial Cellic CTec 3 (Novozymes®) com concentração de 10 FPU/g-cel sobre o teor de sólido, a 50°C, com pH de 4,8, por 48 horas. Na fermentação foi utilizado o caldo hidrolisado proveniente do processo de hidrólise do bagaço pré-tratado após filtração, e melação proveniente do processo de fabricação de açúcar da USM, com leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. A conversão do bagaço na hidrólise foi de 23,5 g/L de glicose resultando no rendimento de 77,8% e a conversão de glicose em etanol na fermentação foi de 56,25 g/L resultando em um rendimento de 78,3%. Com isso pode-se concluir que a obtenção do etanol de segunda geração a partir das matérias lignocelulósicas da cana-de-açúcar é possível utilizando esses métodos.

Palavras chaves: Etanol. Biomassa. Lignocelulósica.

ABSTRACT

The scarcity of oil reserves along with society's concerns with environmental preservation, ethanol turned a sustainable source of energy of great importance. However, many studies of second generation ethanol from lignocellulosic materials of cane sugar needs to be performed. The aim of this study was to analyze the process steps as pretreatment by steam explosion, enzymatic hydrolysis and fermentation of hydrolyzate broth. The work was performed in the Sugarcane Technology Center (CTC) laboratories, which analyzed the characteristics of the nature bagasse of sugarcane, concerning the contents of cellulose, hemicellulose and lignin. Pretreatment of bagasse sugarcane was conducted in a steam explosion reactor at temperatures around 195 ° C for a specified retention time. The pretreated bagasse was subjected to enzymatic hydrolysis using commercial enzyme Cellic Ctec 3 (Novozymes ®) at a concentration of 10 FPU/g-cel on the solid content at 50°C , pH 4.8 for 48 hours . In the hydrolyzate fermentation broth from the hydrolysis of pretreated bagasse after filtration process, and molasses from the sugar manufacturing process of the USM with yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used. The conversion of bagasse hydrolyzate was 23.5 g/L glucose resulting in yield of 77.8% and the conversion of glucose to ethanol during fermentation was 56.25 g/L resulting in a yield of 78.3%. Thus it can be concluded that obtaining the second generation ethanol from lignocellulosic materials of cane sugar is possible using these methods.

Keywords: Ethanol. Biomass. Lignocellulose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da fermentação descontínua e descontínua alimentada	18
Figura 2 - Fluxograma da fermentação contínua	19
Figura 3 - Composição da cana de açúcar	21
Figura 4 - Esquema da estrutura lignocelulósica	24
Figura 5 - Esquema da estrutura linear da celulose	25
Figura 6 - Estrutura simplificada da lignina.....	28
Figura 7 - esquema do pré-tratamento da matéria lignocelulósica.....	29
Figura 8 - Hidrólise de 4-O-metil-glucuranoxilana e celulose	32
Figura 9 - Mecanismo de desidratação de pentoses, formando furfural.....	35
Figura 10 - Representação esquemática da hidrólise enzimática da celulose	37
Figura 11 - Reator de explosão a vapor	41
Figura 12 - 1 bagaço in natura; 2 bagaço pré tratado explosão a vapor	42
Figura 13 - Analisador Biológico YSI; cromatografia a líquido de alta eficiência	43
Figura 14 - Determinação de Sólidos Solúveis.....	52
Figura 15 - Bagaço preparadas, dentro dos frascos apropriados para hidrólise	52
Figura 16 - Hidrólise do bagaço com ácido concentrado 72% a 45°C	53
Figura 17 - Amostras de Bagaço depois da hidrólise na autoclave	53
Figura 18 - Neutralização das amostras com carbonato de cálcio.	54
Figura 19 - Amostras de Bagaço antes e depois da hidrólise ácido concentrado	54
Figura 20 - Filtração do material após hidrólise.....	55
Figura 21 - Determinação de cinzas nas amostras de bagaço.....	55
Figura 22 - Bagaço antes e após o tratamento explosão a vapor	58
Figura 23 - Gráfico de conversão versus tempo de hidrólise	59
Figura 24 - Gráfico de variação de pH durante o processo enzimático.	61
Figura 25 - Biomassa durante a hidrolise(A);Caldo hidrolisado sendo filtrado(B)	61
Figura 26 - Consumo de glicose durante a fermentação	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

CTC - Centro de Tecnologia Canavieira

FPU - Unidade de Papel de Filtro

IAA - Instituto do Açúcar e do Alcool

LIA - Lignina insolúvel em ácido

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

NREL - Laboratório Nacional de Energia Renovável dos Estados Unidos

Proálcool - Programa Nacional do Alcool

RIA - Resíduo insolúvel em ácido

SS - Sólido solúvel

UNICA - União da Indústria de Cana-de-açúcar

USM - Usina São Manoel S/A

ART - Açúcares redutores totais

NREL - Laboratório de Energia renovável

BPT - Bagaço pré-tratado

RIA - Resíduos insolúveis em ácido

LIA - Lignina insolúvel em ácido

HMF - Hidroximetilfurfural

MF - Metil furfural

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	PRODUÇÃO DE ETANOL NO BRASIL	15
3.1.1	História da cana.....	20
3.1.2	Característica fisiológica	20
3.1.3	Materiais lignocelulósicos da cana-de-açúcar como alternativa para produção de etanol	21
3.1.4	Características estruturais da biomassa lignocelulósica	22
3.1.5	Celulose	25
3.1.6	Hemicelulose	26
3.1.7	Lignina.....	27
3.2	PRODUÇÃO DO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.....	28
3.2.1	Pré-tratamento	29
3.2.2	Pré-tratamento explosão a vapor	30
3.3.3	Pré-tratamento ácido.....	33
3.3.4	Pré-tratamento alcalino.....	34
3.3.5	Inibidores	34
3.3.6	Hidrólise enzimática	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	MATERIAL	39
4.1.1	Bagaço de cana-de-açúcar	39
4.1.2	Enzimas	39
4.1.3	Microrganismo fermentativo	39
4.1.4	Meios de cultura	39
4.2	MÉTODOS	40
4.2.1	Pré-tratamento do bagaço por explosão a vapor	40
4.2.2	Hidrólise enzimática	42
4.2.3	Fermentação	44
4.3	MÉTODOS ANALÍTICOS	45
4.3.1	Determinação da massa seca.....	45
4.3.2	Análise composicional do bagaço de cana-de-açúcar	45
4.3.3	Determinação de sólidos totais.....	46
4.3.4	Determinação de sólidos solúveis.....	46
4.3.5	Determinação de carboidratos estruturais e lignina	47
4.3.6	Determinação de cinzas.....	51
4.3.7	Figuras ilustrativas.....	52
4.3.8	Atividade enzimática	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	RESULTADOS DO PRÉ-TRATAMENTO EXPLOSÃO A VAPOR	57
5.2	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA	59

5.3	FERMENTAÇÃO DO CALDO HIDROLISADO.....	62
5.4	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA IN NATURA	64
6	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

A necessidade energética está associada com a estrutura e a dinâmica da sociedade humana atual, assim como o petróleo tem sua importância nesse suplemento energético, o etanol adquiriu sua importância em paralelo.

A crise energética mundial por elevações dos preços de fontes energéticas fósseis e o desenvolvimento em paralelo de fontes alternativas de energia no Brasil transformaram o etanol como uma das principais alternativas energéticas mundiais. O Brasil é reconhecido mundialmente por seu pioneirismo na introdução em sua matriz energética de um biocombustível produzido a partir da cana-de-açúcar: o etanol. Hoje é um exemplo (no mundo) da introdução de energia renovável com uma grande escala de produção.

Na busca por um biocombustível que venha substituir o petróleo (uma fonte de combustível fóssil, não renovável, extremamente poluente e com preços elevados), juntamente com as preocupações da sociedade com a preservação ambiental, são os principais motivos de uma enorme gama de estudos nesta área de pesquisa que vem, crescentemente, experimentando uma nova fase de desenvolvimento, motivado principalmente pelo despertar de uma maior consciência ecológica e ambiental em nossas atividades industriais e está sendo estabelecidos em vários países, visando a identificação de fontes renováveis e tecnologias com alternativas que permitam uma relativa autonomia energética. (RAMOS et al., 2003).

Com o aumento da produção de etanol como uma fonte de energia sustentável, irão diminuir o impacto do aumento do preço do petróleo, preocupações ambientais como poluição do ar e gases do efeito estufa, e proporcionará oportunidades para as comunidades rurais. (LEITE; CORTEZ, 2008).

Até a década de 70, o etanol no Brasil era somente um subproduto das indústrias canavieiras. Com a crise do petróleo em 1973 o preço do barril triplicou em apenas três meses, obrigando o mundo a buscar alternativas energéticas sustentáveis. Então, em 1975 o Brasil lança o Proálcool (Programa Nacional do Álcool), que estimulava os empresários do setor proporcionando-os empréstimos a juros baixos e um bom preço de venda do produto. O Proálcool, extinto na década de 90, foi um dos mais importantes projetos do planeta para a produção de biocombustíveis, principalmente de etanol e biodiesel. (MARQUES; MARQUES; TASSO JUNIOR, 2001).

Macedo (2007) Comenta que nos últimos anos, a evolução do mercado brasileiro de etanol vem apresentando descompasso entre os crescimentos de demanda potencial e de oferta. Com o forte crescimento da demanda potencial referente à expansão da frota de veículos *flex* e a ausência de investimentos do setor sucroenergético em capacidade produtiva agrícola de cana-de-açúcar (expansão de área de plantio da cana-de-açúcar) esta situação agravar-se-á. (CARVALHO, 2006).

O interesse de intensificar a produção do etanol, junto com a biotecnologia, proporciona viabilizar o processo de produção do etanol a partir dos resíduos agroindustriais como as matérias lignocelulósicas (bagaço e palha de cana-de-açúcar). A produção do etanol a partir da biomassa coloca o Brasil em destaque, por possuir uma disponibilidade dessas matérias primas renováveis com sua atividade atual (sobra de bagaço e palha de cana). (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

O etanol pode também ser produzido por via biológica (convencional), sinteticamente a partir do etanol sintético ou ainda a partir da utilização da biomassa lignocelulósicas proveniente de resíduos naturais como bagaço, palha de cana-de-açúcar, sabugo ou palha do milho, entre outras sobras. (FERREIRA, 2012). Para obtenção do etanol a partir da biomassa, utilizam-se os processos físico, químicos e biológicos por meio do emprego de enzimas, catalisadores (ácido/base) e processos físicos (temperatura e pressão) que ajudam na quebra das moléculas lignocelulósicas e na produção de açúcares para processo biológico (fermentação). (SILVA, 2009). A utilização da biotecnologia para a produção do etanol é indiscutivelmente considerado um avanço na cadeia produtiva do combustível. (BASTOS, 2007).

Atualmente, pesquisas em laboratório e plantas piloto estão voltadas para utilização destes subprodutos, o bagaço da cana-de-açúcar (gerado em grande quantidade pela agroindústria brasileira) como alternativa econômica para produção de biocombustível em um processo que envolve várias etapas, tais como, pré-tratamento, hidrólise e fermentação alcoólica. (SEABRA, 2008). Um dos desafios da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica consiste em determinar o melhor processo para obtenção dos monossacarídeos. O processo de hidrólise escolhido deve ser economicamente viável, em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado. De acordo com Zheng (2009) a tecnologia de conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis

para a produção de etanol vem sendo considerada como uma alternativa promissora para atender à demanda mundial por combustíveis. Apesar de já existirem tecnologias disponíveis para o processamento da celulose, a maioria esbarra em dificuldades técnicas ou econômicas.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi analisar as etapas do processo para produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço da cana-de-açúcar, desde a coleta do bagaço até a fermentação alcoólica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a composição química do bagaço de cana-de-açúcar in natura;
- Acompanhar o pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar na ausência de catalisadores.
- Analisar as modificações físico-químicas causadas pelo pré-tratamento nas estruturas lignocelulósicas e que proporcionaram aumento na acessibilidade química da celulose.
- Caracterizar a composição química das frações solúvel e insolúvel derivadas do pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar;
- Acompanhar à hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados por explosão a vapor, empregando complexos celulásicos comerciais;
- Realizar fermentações dos hidrolisados enzimáticos pela levedura do processo fermentativo da USM, para analisar a fermentabilidade dos mesmos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUÇÃO DE ETANOL NO BRASIL

Na produção do etanol com o processo tradicional no Brasil a matéria prima mais utilizada é a cana-de-açúcar. (UNICA, 2012). O interesse pela utilização e transformação do caldo de cana-de-açúcar em álcool, para movimentação de veículos, começou no início da década de 1920, onde foram feitas as primeiras tentativas de usar o álcool como combustível. Em 1925, surgiu a primeira experiência brasileira com etanol combustível. (MARCOCCIA, 2007). Em 1927, a Usina Serro Grande de Alagoas lançou no Nordeste o álcool-motor. Em 1933, o governo de Getúlio Vargas criou o Instituto do Açúcar e do Álcool (IAA) e, pela Lei nº 737, tornou obrigatória a mistura de etanol na gasolina. Entre as décadas de 1950 e 1970, esse combustível perde importância no mercado nacional graças à disponibilidade e ao baixo preço do petróleo e seus derivados. (SHIKIDA, 2010). Só a partir de 1973 essa situação se altera, com a mudança do cenário internacional, promovido pelo primeiro choque do petróleo, exigindo políticas alternativas e substitutivas de energia. (LEITE; CORTEZ, 2008). Em 14 de novembro de 1975, o presidente Ernesto Geisel, diante da crise energética decorrente da alta do petróleo, busca alternativas e, pelo decreto nº 76.593, cria o Programa Nacional do Álcool ou Proálcool. (MACEDO, 2007). Seu objetivo era estimular a produção do álcool, visando o atendimento das necessidades do mercado interno e externo e da política de combustíveis automotivos. Devido à iniciativa, houve então a expansão da oferta de matérias-primas, com especial ênfase no aumento da produção agrícola, modernização e ampliação das destilarias existentes e da instalação de novas unidades produtoras, anexas a usinas ou autônomas, e de unidades armazenadoras. (OLIVEIRA et al., 2012). Neste programa, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) foi consolidada como a matéria-prima ideal para produção de etanol e, como consequência, estudos nos âmbitos tecnológicos e agrícolas foram intensificados, levando o Brasil a uma posição favorável em termos de segurança energética. (SHIKIDA, 2010). De acordo com o Ministério de Minas e Energia, o Brasil deverá atingir o consumo de cerca de 65 bilhões de litros de etanol em 2020, o que representa acréscimo de 10,5 % ao ano. (UNICA, 2012). Para chegar aos 65 bilhões de litros, é fundamental que o setor sucroenergético siga

investindo na renovação de canaviais, na ampliação da produção, seja por meio de novas usinas ou elevando a capacidade instalada das unidades já existentes e, em especial, em inovação tecnológica. (UNICA, 2012). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento. (CONAB, 2013), a quantidade total de cana moída na safra 2011/2012 foi cerca de 571.471 milhões de toneladas. Para a produção de etanol, foram esmagadas cerca de 287,6 milhões de toneladas, que produziu 22.857,6 bilhões de litros.

O etanol é um dos mais importantes combustíveis renováveis e seu uso em grande escala contribui diretamente para a redução do impacto ambiental do uso indiscriminado de combustíveis fósseis. (ARAÚJO, 2008). Atualmente, o etanol é obtido da fermentação alcoólica dos carboidratos presentes, no caldo de cana-de-açúcar ou em hidrolisados enzimáticos de material rico em amido, como milho e trigo. Para se produzir o etanol a partir da cana-de-açúcar, é essencial um trabalho conjunto entre a lavoura e a indústria, de forma bem planejada nas etapas de corte, escolha de variedades adequadas, com maiores teores de açúcares e o processamento quase imediato para evitar deterioração e perdas de açúcar. (SANTOS; BORÉM; CALDAS, 2010). A sacarose é produzida e armazenada pela própria planta, cabendo à indústria realizar sua extração e purificação e, no caso do álcool, sua transformação. (AMORIM, 2005). O etanol está em expansão por ser um combustível ainda barato, renovável e cujo emprego como alternativa para a matriz energética mundial está em fase de crescimento. A tendência do aumento da produção de etanol no Brasil ocorre por vários fatores, como o aumento da frota de carros bicompostíveis (demanda interna), Protocolo de Kyoto (demanda externa) e aumento do preço do petróleo. (OLIVEIRA, 2010).

O Brasil se encontra em vantagem na produção de etanol, devido a decorrentes e importantes avanços tecnológicos pelos quais passou a cultura da cana ao longo de sua história recente, que envolveram melhoramento genético, mecanização agrícola, gerenciamento, controle biológico de pragas, reciclagem de efluentes e práticas agrícolas. (SANTOS; BORÉM; CALDAS, 2010). Nesse processo, foi fundamental o arranjo institucional estruturado para pesquisas em cana-de-açúcar, que permitiu suprir variedades mais produtivas e resistentes, desenvolvidas graças a programas de melhoramentos genéticos de centros de tecnologias como: CTC, RIDESA, Canavialis entre outras. Os avanços nas mecanizações (colheita e plantio) foram lentos, mas hoje um importante aliado, em

decorrência da extinção das queimadas nos canaviais imposta pela legislação ambiental, que possibilitou a redução de custos e ganhos de qualidade. (BASTOS, 2007).

O processo de produção do etanol da cana propriamente dito compreende as seções de recepção, preparo e moagem, tratamento do caldo, fabricação do açúcar e destilaria de álcool, além das utilidades, disposição de efluentes e estocagem de produtos. A produção do etanol por via fermentativa é dividida em três fases: o preparo do substrato e do inóculo, a fermentação e a destilação.

O preparo do substrato é o tratamento da matéria-prima (mosto), da qual serão extraídos os açúcares fermentescíveis que resultarão no produto final, o etanol. O preparo do inóculo consiste em fornecer à levedura as condições ideais para que o processo fermentativo ocorra com uma boa eficiência.

A fermentação é comum a todos os substratos, portanto, após serem fermentados, são chamados de vinho levedurado, sendo uma mistura de substâncias líquidas, sólidas e gasosas de constituição variável. Na destilação do vinho, recupera-se o etanol dos demais componentes. (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

O processo de fermentação pode ser conduzido de três maneiras distintas, são elas: descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo. Os dois tipos mais utilizados no Brasil são o descontínuo alimentado e o contínuo. (DORTA, 2006).

De acordo com Amorim (2005), no processo descontínuo, também conhecido como batelada (Figura 1), cada dorna (reator da fermentação) recebe o inóculo previamente tratado contendo uma suspensão de células ativas, e o mosto, formando uma mistura que permanece no fermentador até o final do processo. A separação da levedura do vinho pode ser feita por centrifugação ou decantação, podendo ser tratada para posteriormente voltar a ser utilizada em um novo ciclo fermentativo.

A condução do processo descontínuo alimentado ou batelada alimentada (Figura 2) permite maior controle do efeito inibitório do açúcar durante a fase inicial da fermentação, em que a alimentação pode ser controlada, aumentando gradualmente durante um período de 4h, o que resulta maior eficiência na produção do etanol num mesmo intervalo de tempo quando comparado com o processo descontínuo. (DORTA, 2006). O processo descontínuo alimentado apresenta vantagens quanto ao controle de bactérias contaminantes.

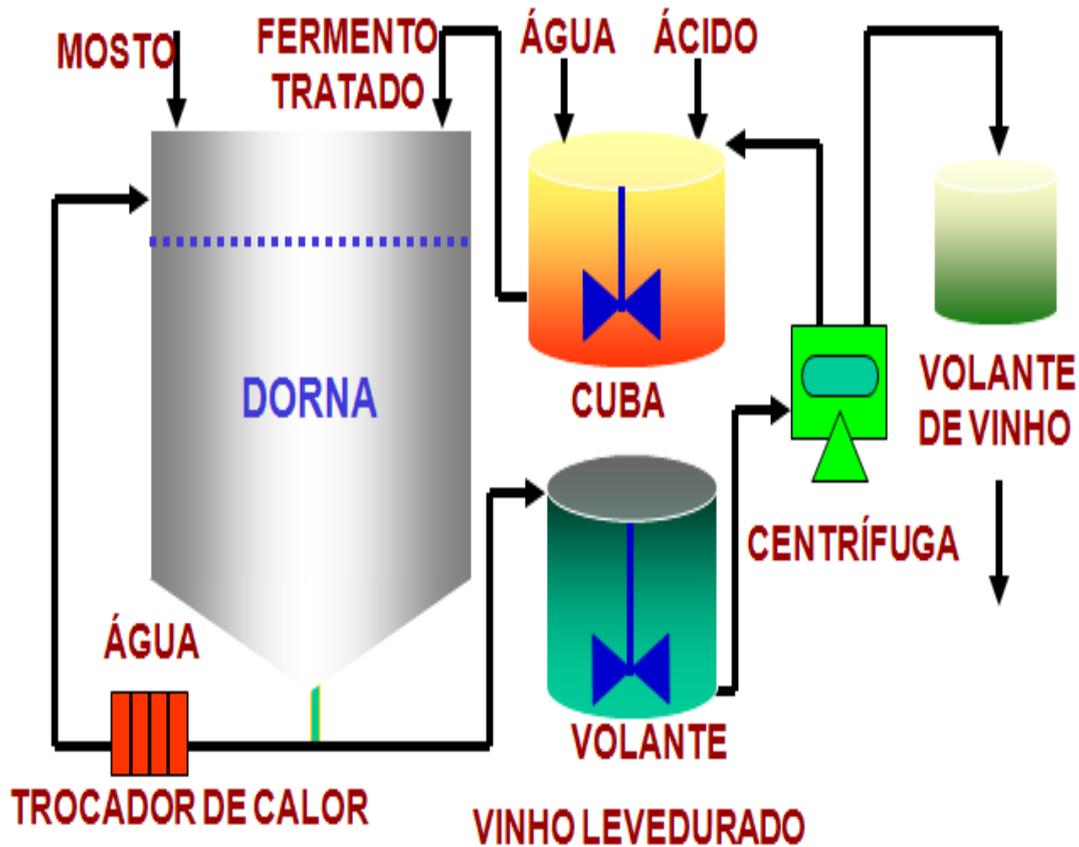


Figura 1 - Fluxograma da fermentação descontínua e descontínua alimentada.
 Fonte: Vitoretti (2012, p.14).

No processo contínuo (Figura 2), o substrato e o inóculo são adicionados e retirados de forma contínua nas dornas de fermentação. É considerado um método mais vantajoso, pois inclui otimização das condições de processo conseguindo maior produtividade, maior capacidade volumétrica contínua, redução de custo em instalações e equipamentos. (DORTA, 2006). A maior desvantagem é a de que fermentações contínuas estão mais expostas a contaminações bacterianas, e exigem um profissional especializado.

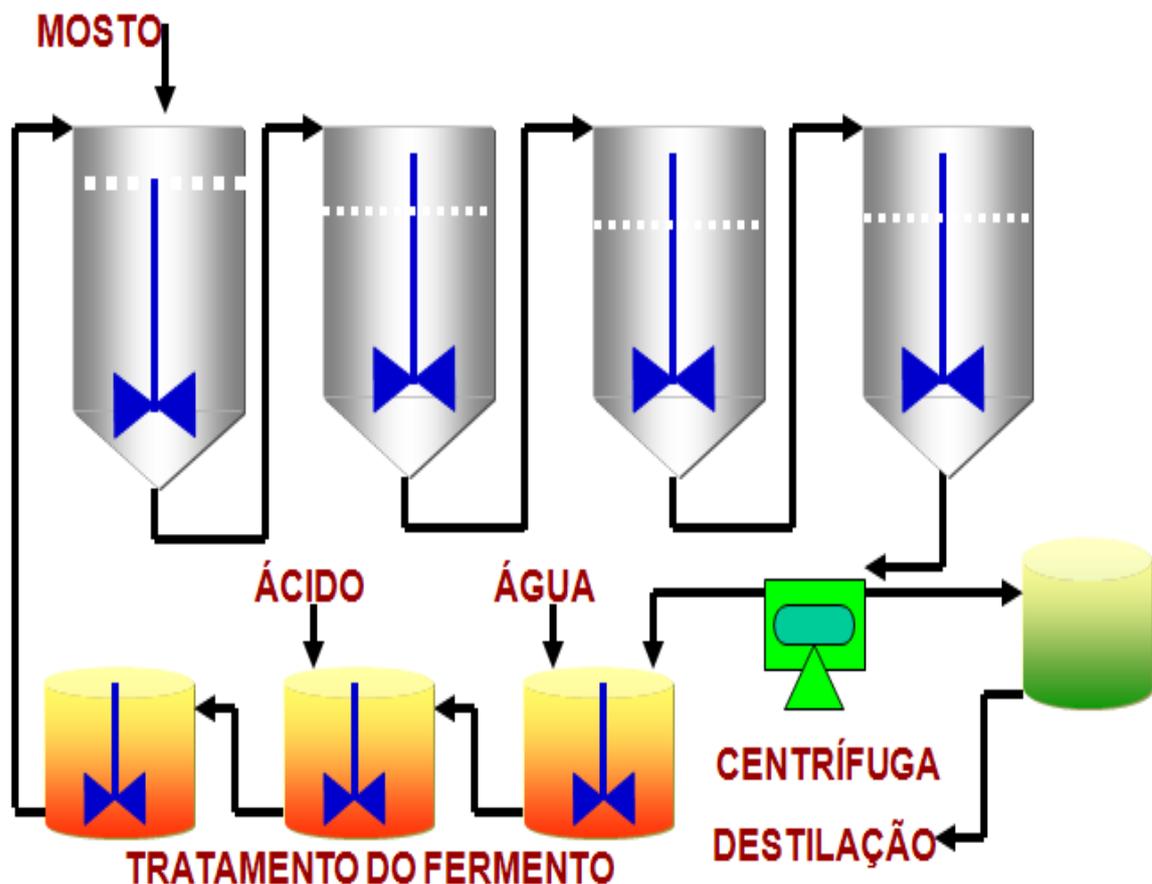


Figura 2 - Fluxograma da fermentação contínua.
 Fonte: Vitoretti (2012 p.15).

A obtenção de etanol por via fermentativa parece um processo simples, são necessários alguns pré-requisitos essenciais. Talvez o principal seja o uso de um micro-organismo com uma taxa de crescimento rápido, que mantenha uma uniformidade biológica durante o reciclo e que sintetize o produto de interesse com eficiência. (AMORIM, 2005).

A recuperação do etanol contido no vinho produzido na fermentação é recuperado por colunas de destilação por diferença de ponto de ebulição.

3.1.1 História da cana

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido da Índia, China, Tailândia e Paquistão. No Brasil, a cana-de-açúcar utilizada, principalmente na produção de álcool (anidro e hidratado) e açúcar, é uma das culturas agrícolas mais importantes em países tropicais, gerando diversos recursos e empregos diretos, e contribuindo, dessa forma, para o desenvolvimento com melhores fontes de renda. O interior paulista, principal produtor mundial de cana-de-açúcar, é uma das regiões mais desenvolvidas do Brasil, possuindo elevados índices de desenvolvimento urbano e renda *per capita* muito acima da média nacional. (UNICA, 2012).

De acordo com Marques; Marques, T.; Tasso Junior, (2001, p. 1) a provável origem da cana-de-açúcar é o norte da Índia:

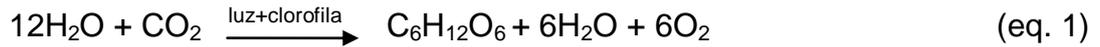
[...] Há referências sobre a produção de açúcar na Pérsia por volta de 500 D.C., da Pérsia, foi levado para a costa ocidental através do mar mediterrâneo e daí para a Espanha, por volta do século VIII. No século XI e XII, através das Cruzadas, espalhou por toda Europa, África, China, e alcançando a Ilha Madeira. Na América foi introduzida por Colombo em São Domingo, em 1494. No Brasil, o plantio iniciou-se em São Vicente, em 1522, trazida por Martim Afonso de Souza. O primeiro engenho foi chamado São Jorge dos Erasmos. Dois anos depois, dava-se a instalação em Pernambuco. No século XVII, a indústria teve uma expansão com a ajuda dos holandeses, aumentando a produção de açúcar na época.

Nos séculos XIX e XX, a agroindústria canavieira passou por período de altos e baixos, com a concorrência de outras culturas.

3.1.2 Característica fisiológica

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) possui aparato fotossintético C_4 , com alta eficiência na conversão de energia radiante em energia química. O processo de fotossíntese refere-se a uma série de reações, as quais envolvem absorção da luz, conversão de energia, transferência de elétrons e múltiplos processos, dos quais participam enzimas para a conversão de CO_2 e água em açúcares. (LEHNINGER, 2000).

O processo de fotossíntese pode ser representado pela equação simplificada de redução.



A cana consegue fixar cerca de 100 mg de CO_2 por dm^2 de área foliar por hora, essa alta taxa de conversão fotossintética promove um acúmulo de biomassa em seu longo período vegetativo. (SANTOS, 2010).

A constituição química da cana depende de diversos fatores entre eles: o tipo de solo, clima, adubação, as técnicas de colheita e o manuseio empregado. (RODRIGUES; CAMARGO, 2008).

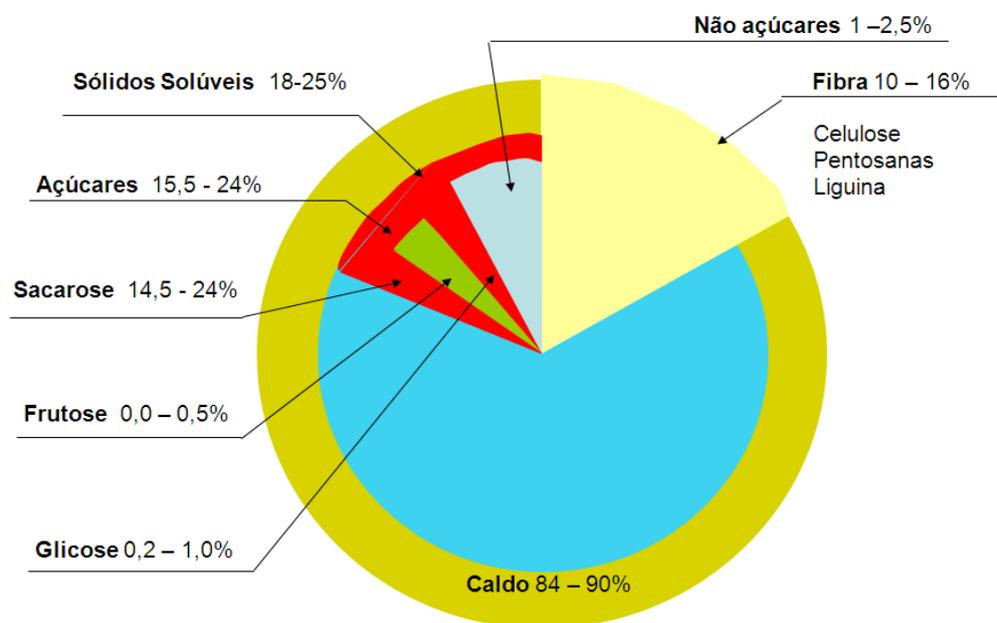


Figura 3 - Composição da cana-de-açúcar.
Fonte: Usina São Fernando (2013).

3.1.3 Materiais lignocelulósicos da cana-de-açúcar como alternativa para produção de etanol

O crescente desenvolvimento alcançado pela agroindústria canavieira, principalmente na produção de etanol combustível, tem gerado um atraente incentivo no aproveitamento do bagaço produzido, devido à inserção de novas e mais avançadas tecnologias agrícolas e industriais, e na recuperação integral ou parcial da palha e bagaço de cana-de-açúcar, proporcionado desta forma, incentivos no desenvolvimento e produção de bioetanol a partir de fontes alternativas como resíduos agrícolas. (BASTOS, 2008). A necessidade de um aumento significativo na produção de etanol, sem aumentar a exploração das terras cultiváveis, leva à

constatação de um novo padrão de produção de energia a partir da biomassa, em especial de resíduos lignocelulósicos. (BENEDETTI; CHAVES; MAGALHÃES, 2009).

Segundo Macedo (2007) Devido ao grande aumento na produção do etanol nos últimos anos, resta pouca perspectiva da mesma continuar crescendo no mesmo ritmo. Uma das alternativas das indústrias para continuar aumentando a produção deste combustível é utilizar os subprodutos formados como fonte de energia. (SANTOS et al., 2012). Dentre estes subprodutos o bagaço de cana-de-açúcar certamente ocupa uma posição de grande destaque nas atividades agrícolas brasileiras. A produção anual de bagaço atinge enormes cifras, levando ao reconhecimento que este bagaço também pode ser utilizado na produção de combustível. (BASTOS, 2008). O bagaço abastece as caldeiras das usinas na geração direta de energia por combustão ou gaseificação. Muito se tem investido em tecnologias para o aproveitamento total da cana-de-açúcar. A utilização deste bagaço excedente poderia suprir o abastecimento da usina sucroalcooleira, proporcionando vantagens socioambientais e elevação do rendimento econômico do processo. (GÁMES et al., 2006).

3.1.4 Características estruturais da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica constitui a maior fonte de carboidratos naturais do mundo. (SARKO, 1997). A dificuldade de converter a biomassa lignocelulósica em insumos químicos é atribuída às suas características químicas e morfológicas. Esses materiais lignocelulósicos são constituídos principalmente de polímeros de celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$, envolvidas em uma matriz amorfa de hemicelulose $(C_5H_{10}O_4)_m$, lignina $[C_9H_{10}O_3.(OCH_3)_{0,9-1,7}]$ e também são encontrados outros polissacarídeos na parede celular vegetal, dentre eles a pectina, que faz parte de um grupo de substâncias denominadas substâncias pécticas, as quais incluem o ácido péctico, o ácido pectínico e protopectina. (ARIN; DEMIRBAS, 2004). Essa matriz amorfa age como uma barreira natural ao ataque de micro-organismos e/ou enzimas e torna esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos. A composição química da biomassa lignocelulósica, geralmente contém 35-50% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos. (ZHANG; LYND, 2004). Esta composição química varia em função do tipo de biomassa, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição química de biomassas Lignocelulósicas.

Biomassa Lignocelósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Palha de Cana	40 - 44	30 - 32	22 - 25
Bagaço de Cana	32 - 48	19 - 24	23 - 32
Madeira Dura	43 - 47	25 - 35	16 - 24
Madeira Mole	40 - 44	25 - 29	25 - 31
Talo de Milho	35	25	35
Espiga de Milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de Trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de Arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de Milho	38 - 40	28	7 - 21
Fibra de Coco	36 - 43	0,15 - 0,25	41 - 45
Fibra de Bananeira	60 - 65	6 - 8	5 - 10
Palha de Cevada	31 - 45	27 - 38	14 - 19

Fonte: Santos (2012 p. 21).

Segundo Bon; Ferrara; Corvo, (2008) a celulose é o polímero natural de maior ocorrência no mundo. A sua estrutura pode ser classificada em três níveis organizacionais. O primeiro é definido pela sequência de resíduos β -D-glicopiranosídicos unidos por ligações covalentes, formando o homopolímero de anidro glicose com ligações β -D (1 \rightarrow 4) glicosídicas, de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$. O segundo nível descreve a conformação molecular, isto é, a organização espacial das unidades repetitivas, e é caracterizado pelas distâncias das ligações e respectivos ângulos e pelas ligações de hidrogênio intramoleculares. O terceiro nível define a associação das moléculas formando agregados com uma determinada estrutura cristalina. Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornando a celulose insolúvel em água e em um grande número de outros solventes.

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos, estruturalmente mais semelhantes à celulose do que a lignina. Sua estrutura apresenta ramificações que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado. (ZHANG; PAN; ZHANG, 2009). Comparadas com a celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores. Esta reatividade é usualmente atribuída ao caráter amorfo destes polissacarídeos. A lignina, depois da celulose, é a macromolécula mais abundante dentre as biomassas

lignocelulósicas. A estrutura da lignina não é homogênea, possui regiões amorfas e estruturas globulares. A composição e a organização dos constituintes da lignina variam de uma espécie para outra, dependendo da matriz de celulose-hemicelulose. No processo de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, a lignina atua como uma barreira física para as enzimas que podem ser irreversivelmente capturadas pela lignina e, conseqüentemente, influenciar na quantidade de enzima requerida para a hidrólise, assim como dificultar a recuperação da enzima após a hidrólise. (SILVA, 2009).

Devido à íntima associação recalcitrante existente entre os três componentes poliméricos da biomassa, a liberação dos polissacarídeos como fonte de açúcares fermentescíveis para produção de etanol está entre as mais importantes e urgentes prioridades nas áreas de pesquisa e desenvolvimento do etanol celulósico.

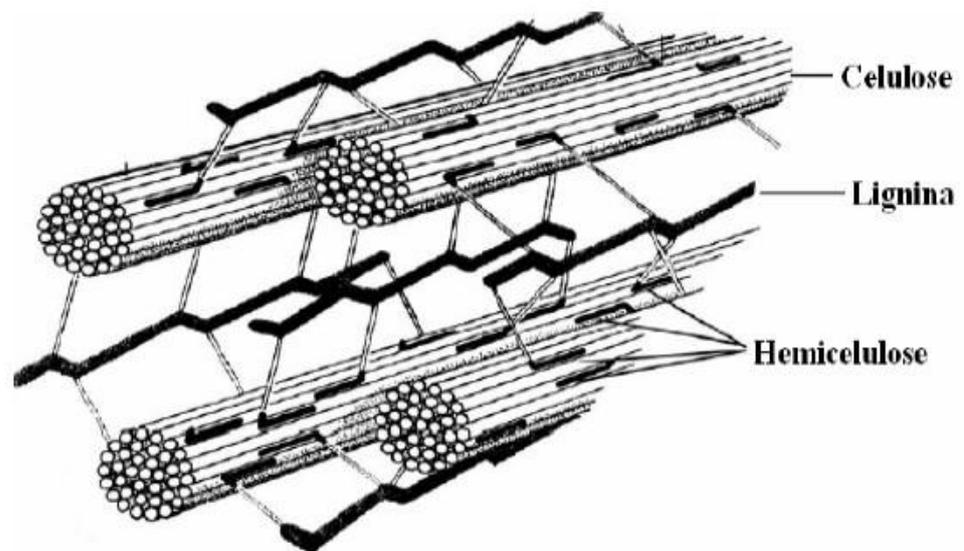


Figura 4 - Esquema da estrutura lignocelulósica
Fonte: Camargo (2012, p. 6).

3.1.5 Celulose

A celulose ($C_6H_{10}O_5$) $_n$, principal componente da parede celular da fibra vegetal, é um polímero de cadeia longa composto de um só monômero (glicose) e por isso classificado como homopolissacarídeo. É a matéria orgânica mais abundante sobre a terra, consistindo aproximadamente em 50% de toda a biomassa e uma produção anual de cerca de 100 bilhões de toneladas (BENEDETTI; CHAVES; MAGALHÃES, 2009).

A celulose é um homopolissacarídeo linear que consiste em unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) cujo tamanho é determinado pelo grau de polimerização. As cadeias de celulose formam as fibrilas elementares, uma estrutura altamente ordenada que se associam formando as fibras celulose, caracterizadas por duas regiões distintas, a cristalina, de configuração mais ordenada formada por cadeias de celulose unidas por ligações de hidrogênio e força de Van der Waal's, e a amorfa, menos ordenada e mais susceptível a hidrólise (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

As longas cadeias de glicose, combinadas a formar microfibrilas com diâmetro entre 4-10 nm em eletromicrofibrilas tornam a celulose resistente. O conjunto de microfibrilas, aos quais são organizadas em lamelas para formar a estrutura fibrosa das várias camadas da parede celular vegetal. As microfibrilas de celulose são revestidas com hemicelulose e embebidas em lignina, formando os materiais lignocelulósicos (RABELO, 2010).

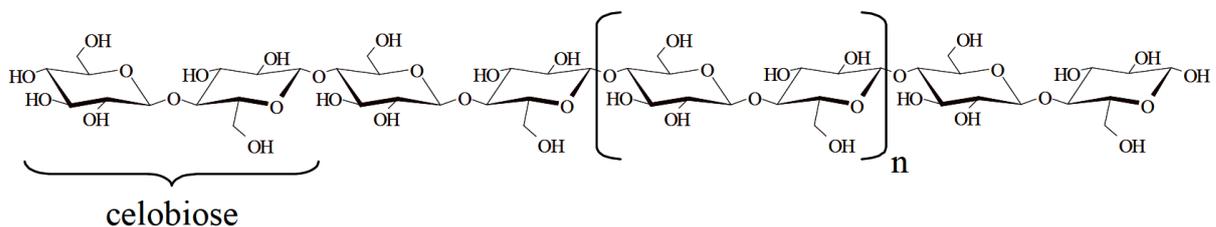


Figura 5 - Esquema da estrutura linear da celulose
Fonte: Santos (2012 p. 22)

3.1.6 Hemicelulose

As hemiceluloses são polissacarídeos formados por diferentes unidades de açúcares pertencentes aos grupos das pentoses, hexoses, ácidos hexourônicos e desoxiexoses. A hemicelulose possui cadeias ramificadas de açúcares, como principal elemento a xilose é um heteropolissarídeo formado por pentoses (xilose, ramnose e pentose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (ácidos-4-O-metil-glucurônico e galacturônico). A xilose constitui o maior componente da hemicelulose, fazendo parte de um complexo de carboidratos poliméricos incluindo xilana (principal componente da hemicelulose, cuja estrutura corresponde a um polímero de D-xilose unidas por ligações β -1,4). (BALAT et al., 2008).

Estes polissacarídeos consistem, principalmente, de cadeias poliméricas ramificadas com grau de polimerização de 100 a 200 unidades de açúcares, entre os quais incluem, como principais componentes: glicose, galactose, manose, xilose, arabinose e ácido glucurônico, que podem ser lineares ou ramificados, além de serem amorfos e possuírem massa molecular relativamente baixa. (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009).

As hemiceluloses encontram-se intercaladas às microfibrilas de celulose, promovendo a elasticidade e impedindo que elas se toquem. (RAMOS, 2003). Estas macromoléculas são solúveis em água e facilmente solubilizados em solução alcalinas. Apresentam-se divididas em xilanas, mananas, galactanas e galacturonanas e suas unidades monoméricas são unidas por ligações do tipo 1,3; 1,4 e 1,6. Destas moléculas, as presentes em maiores proporções são as xilanas, que consistem em moléculas de xilose unidas por ligação β -1,4. (BANERJEE et al., 2002).

Diferentemente da celulose, as hemiceluloses são constituídas por vários tipos de unidades de açúcares. Estas macromoléculas são ramificadas e apresentam cadeias curtas, além de serem solúveis em álcalis fortes e são fundamentalmente amorfas, sendo mais suscetíveis a pré-tratamentos químicos. (ROCHA; SILVA, 2006).

3.1.7 Lignina

A lignina, depois da celulose e das hemiceluloses, o polímero mais abundante na natureza e está presente na parede celular como um material polifenólico amorfo com estrutura tridimensional baseada em três precursores monoméricos: os álcoois coniferílico, sinapílico e p-cumarílico. (DENCE; LIN, 1992).

A lignina, um dos principais componentes presente no bagaço de cana-de-açúcar é um polímero derivado de grupos fenilpropanóides, repetidos de forma irregular, que têm sua origem na polimerização desidrogenada do álcool coniferílico. Os polímeros fenilpropanóides que constituem a lignina são altamente condensados e muito resistentes à degradação. (OLIVEIRA, 2010).

A lignina é o mais importante componente não-carboidratado da biomassa lignocelulósica. Ela é depositada na rede de carboidratos da parede celular secundária das plantas, durante o seu crescimento. As ligninas são formadas a partir de três precursores básicos, que são os álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico. Este heteropolímero amorfo é constituído de unidades de fenilpropano (ácido coniferílico ou ferrulico, ácido sinapílico e ácido pcumarílico) conectadas por diferentes ligações. (SILVA, 2009).

A lignina ocorre na parede celular de plantas superiores em diferentes composições: madeiras duras de 25 a 35%, madeiras macias de 18 a 25% e gramíneas de 10 a 30% sendo neste último caso responsável, em parte, pela resistência mecânica do bagaço, bem como no suporte para dispersão dos metabólicos exercidos pelas células. (BASTOS, 2007).

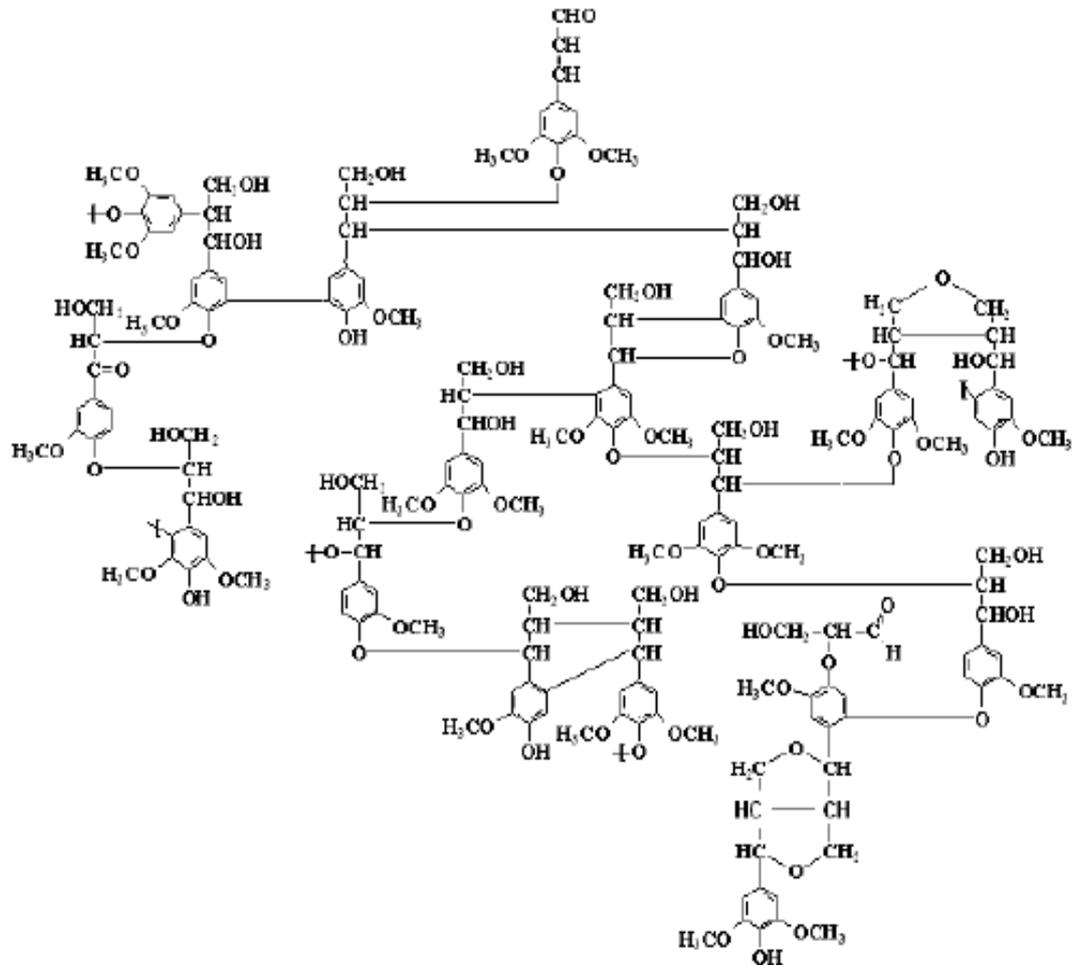


Figura 6 - Estrutura simplificada da lignina
 Fonte: Santos et al. (2012 p. 1006).

3.2 PRODUÇÃO DO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

A sacarificação dos lignocelulósicos dos resíduos agrícolas sempre foi considerado um caminho promissor para a produção de combustíveis e produtos químicos a partir de fontes renováveis.

Para produzir etanol da matéria lignocelulósica é necessário disponibilizar os açúcares da matéria, que se encontram em forma de polímeros agrupados formando a estrutura do vegetal. (BON; FERRARA; CORVO, 2008). Para isso se utilizam diversos processos, pois o bagaço é fortemente recalcitrante, devido à forte ligação existente entre a celulose hemicelulose e lignina. (ROCHA et. al., 2006). A produção de etanol celulósico é realizada em quatro etapas sequenciais: o pré-tratamento da biomassa, que visa aumentar a acessibilidade dos carboidratos à conversão; a hidrólise enzimática, que converte os carboidratos em açúcares fermentescíveis; a fermentação, que é responsável pela produção de etanol; e, finalmente, a

recuperação do etanol por destilação. (PITARELO, 2013). Os processos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação de todos esses, o que dependerá do grau de separação requerido e do fim proposto. As demais etapas de fermentação e destilação seguem os mesmos processos da produção de etanol convencional. (FERREIRA, 2012).

3.2.1 Pré-tratamento

O pré-tratamento é essencial para a bioconversão das matérias lignocelulósicas, que possui caráter altamente recalcitrante, causando várias barreiras físicas e químicas que inibem significativamente a sua susceptibilidade à bioprocessos tais como a hidrólise e na fermentação. (ROCHA, 2006).

A matéria lignocelulósica da cana como outras fibras vegetais possuem estruturas organizadas, de difícil desestruturação. Esta etapa de pré-tratamento é necessária antes da hidrólise enzimática para tornar a celulose mais acessível ao ataque das enzimas. (WANDERLEY, 2012). A Figura 7 apresenta um esquema de pré-tratamento de material lignocelulósico.

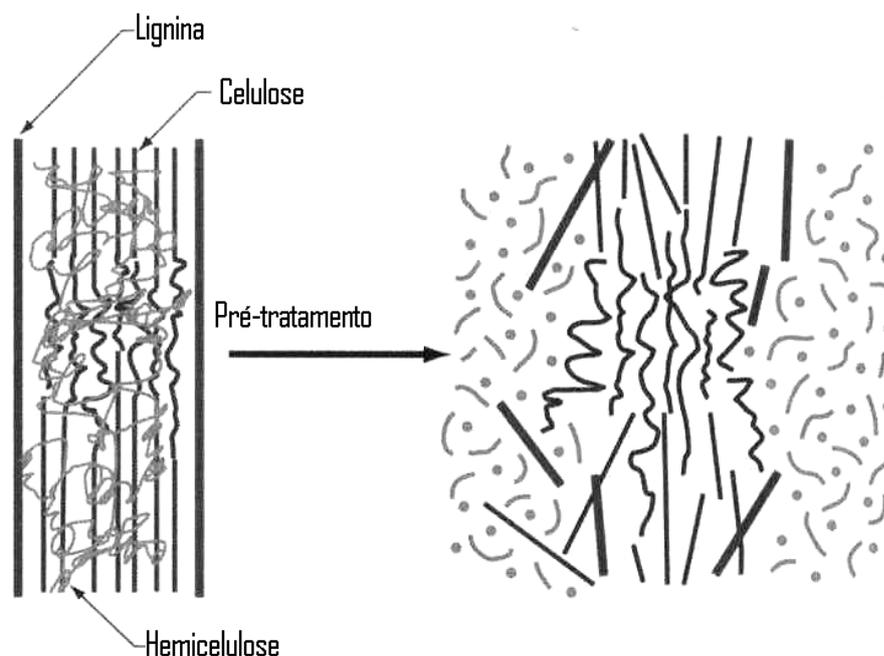


Figura 7 - esquema do pré-tratamento da matéria lignocelulósica
Fonte: Wanderley (2006 p. 9).

3.2.2 Pré-tratamento explosão a vapor

O processo de explosão a vapor atua tanto química como fisicamente na estrutura do material lignocelulósico por estar baseado no contato direto da biomassa com vapor saturado a alta pressão por um determinado tempo de exposição no reator, seguido de descompressão rápida à condição atmosférica (explosão). Ao longo deste processo, as ligações que asseguram a coesão da biomassa são fragilizadas e em parte quebradas, de forma que, no momento da descompressão, o material é desfibrado com facilidade e assim reduzido a partículas menores, aumentando a área superficial de contato e diminuindo a resistência da parede celular à sacarificação. (PITARELO, 2013).

Durante o processo de pré-tratamento por explosão a vapor, todos os componentes da biomassa sofrem hidrólise, mas as hemiceluloses são as mais susceptíveis a este tipo de reação. Sob a ação da temperatura e da pressão do vapor, os grupamentos acetila presentes nas hemiceluloses são hidrolisados a ácido acético e o ácido liberado no meio catalisa a quebra das ligações do complexo lignina-carboidrato, provocando a solubilização de grande parte das hemiceluloses, que passam a ser facilmente removidas por extração aquosa. A fração insolúvel em água contém celulose e lignina parcialmente modificada, sendo que a maior parte desta lignina pode ser removida por extração com álcali, etanol ou dioxano. (BALAT et al., 2008).

As condições consideradas ótimas para pré-tratamento da biomassa com vapor de alta pressão para um determinado vegetal são definidos como aqueles em que o melhor resultado nos processos de hidrólise e fermentação, e com menor quantidade de açúcares solúveis perderam a reações secundárias, tais como a desidratação. (ROCHA et al., 2012). Portanto, a otimização de resultados está em entre duas tendências opostas, pois a recuperação hemicelulose em hidrolisados ácido só pode ser maximizado com menores severidades pré-tratamento, enquanto que o desenvolvimento da acessibilidade substrato exige condições de pré-tratamento mais drásticos em que as perdas de açúcar são inevitáveis. (RAMOS, 2003). Para ter em conta esta heterogeneidade, a importância de alguns parâmetros são essenciais para processos, tais como a temperatura de pré-tratamento, o tempo de residência no reator de vapor, a utilização de um catalisador ácido, a

susceptibilidade da biomassa pré-tratada para a bioconversão, e concepção do processo. (PITARELO et al., 2012).

Esse processo pode ocorrer com ou sem a presença de catalisadores químicos (ácido sulfúrico, dióxido de enxofre, e amônia). A operação se dá a altas temperaturas (160-260°C) e pressão, durante certo período de tempo (de alguns segundos até vários minutos), seguindo-se de uma rápida redução da pressão, o que permite que os materiais sofram uma explosão por descompressão. (ROCHA; SILVA, 2006).

Quando não existe adição de catalisador, o pré-tratamento a vapor é conduzido por auto-hidrólise e a clivagem das ligações glicosídicas é realizada principalmente pelos catalisadores ácidos da própria biomassa. Embora o ácido acético, considerado o principal catalisador em auto-hidrólises, liberado a partir de acetilados da hemicelulose, outros ácidos tais como os ácidos fórmicos e levulínicos também são produzidos e podem efetuar um papel importante na eficiência do pré-tratamento. (RAMOS, 2003). Para produção de etanol de segunda geração, se faz necessário redução de custo para se tornar viável em nível de produção industrial, por este motivo não se adiciona nenhum catalisadores no pré-tratamento a vapor ou se adicionar em pequenas quantidades.

O efeito do tratamento por explosão a vapor sobre a organização estrutural da celulose aumenta consideravelmente sua área superficial e, por conseguinte, sua susceptibilidade à hidrólise ácida e/ou enzimática. Por esta razão, este método de pré-tratamento tem sido o mais utilizado para a conversão de biomassa lignocelulósica a etanol. (ÖHGREN et al., 2007). A Figura 8 representa os produtos gerados no pré-tratamento por explosão a vapor no material lignocelulósico.

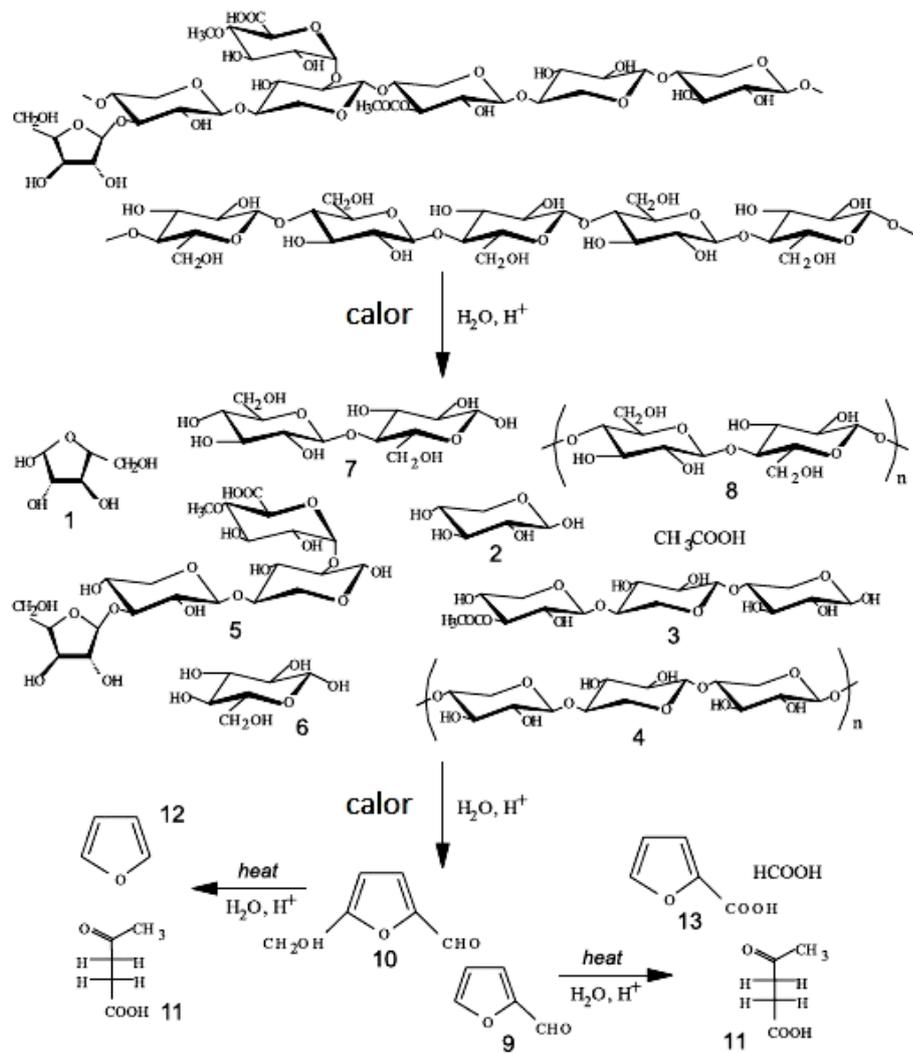


Figura 8 - Hidrólise de 4-O-metil-glucuranoxilana e celulose. (1) Arabinose, (2) Xilose, (3) Xilooligômeros acetilados, (4) Xilooligômeros de grande massa molecular, (5) Oligossacarídeos, (6) Glicose, (7) Celobiose, (8) Celooligômeros, (9) Furfural, (10) Hidroximetilfurfural, (11) Ácido levulínico, (12) Furano e (13) Ácido furanóico.
 Fonte: Pitarello (2007 p. 13).

3.3.3 Pré-tratamento ácido

Esta técnica é efetiva na solubilização do componente hemicelulósico da biomassa, provocando desacetilação e despolimerização da fração hemicelulósica. Combinações entre concentração de ácido, temperatura e tempo de reação podem gerar grandes quantidades de açúcares provenientes da fração hemicelulósica. (BAUDEL, 2006). O processo consiste em aquecer uma solução de ácido mineral juntamente com a biomassa no reator em temperaturas que variam de 140 a 200°C, onde cerca de 80-90% das hemiceluloses são recuperadas majoritariamente na forma de monômeros e 30-50% de lignina é passível de extração alcalina. (GÁMEZ et al., 2006).

Durante o pré-tratamento ácido, os catalisadores liberam prótons que clivam as ligações heterocíclicas de éter entre os monômeros das cadeias macromoleculares da hemicelulose e, no caso de ácidos concentrados, da celulose. (CASTRO, 2010). Após clivagem da hemicelulose são liberadas diversas substâncias, sendo majoritária a presença de xilose, glicose e arabinose na maioria dos materiais lignocelulósicos. Entre os ácidos utilizados para este tipo de pré-tratamento, encontram-se: H_2SO_4 , HCl, HF, CH_3COOH e HNO_3 . (SUN; CHENG, 2002).

A utilização de ácido diluído no pré-tratamento permite uma elevada hidrólise, com quase toda a hemicelulose solubilizada, porém seu custo é normalmente mais elevado que outros processos como a explosão a vapor (autohidrólise), pois é necessária de neutralização do hidrolisado para adequação das etapas subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação. (MARTÍN et al., 2007). Ao empregar elevadas concentrações destes ácidos, o processo demanda complexa configurações de equipamentos, necessitando de elevado consumo de água e energia. (BAUDEL, 2006).

3.3.4 Pré-tratamento alcalino

O tratamento alcalino, empregado após o pré-tratamento ácido ou explosão a vapor, e consiste na remoção de lignina da biomassa, causando o desnovelamento da estrutura lignocelulósica, separando as ligações entre lignina e carboidratos, reduzindo o grau de polimerização, bem como de cristalinidade e aumentando a porosidade das matérias-primas lignocelulósicas. (SUN; CHENG, 2002). A remoção da lignina promove maior conversão das fibras de celulose durante a etapa de hidrólise enzimática. (BALAT et al., 2008).

Os processos geralmente utilizam soda ou cal com condições de operações moderadas de temperatura e pressão, com temperaturas de 50-65°C, mas os tempos de pré-tratamento podem variar de dias ou semanas. (PITARELO, 2013). O tratamento alcalino também pode ser realizado por agentes oxidantes como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou combinação de amônia líquida com explosão a vapor que geralmente aumenta o rendimento de remoção da lignina. (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008).

3.3.5 Inibidores

Devido às altas temperaturas empregadas nos pré-tratamentos químicos, os açúcares originados se degradam, provocando a formação de compostos que podem interferir, posteriormente, no processo de fermentação e hidrólise do material lignocelulósico. Dentre os inibidores estão: ácido acético (formado pela hidrólise do grupo acetil presente na fração hemicelulósica), aldeídos, alcoóis aromáticos, bem como compostos fenólicos (formados principalmente pela degradação parcial da lignina) e furaldeídos, como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural (HMF) (formados pela degradação de pentoses e hexoses); estes que por sua vez podem dar origem a outros produtos, como os ácidos fórmico e levulínico, respectivamente. (MARTIN; KLINKE; THONSON, 2007).

De acordo com AMORIM (2005) o ácido acético é o composto presente nos hidrolisados que apresentou maior grau de inibição, seguido do furfural, o qual apresentou efeito moderado. Adicionalmente, os ácidos orgânicos e os aldeídos resultaram em maiores toxicidades ao microrganismo do que a presença de derivados da lignina e alcaloides. (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). O pré-tratamento

deve ser eficiente em termos de rendimento e funcionalidade, com redução de insumos químicos e de energia, visando uma menor geração desses compostos inibitórios. (BAUDEL, 2006).

O aumento da temperatura e/ou do tempo de exposição do material no reator favorece as reações de hidrólise da celulose e das hemiceluloses, provoca o início das reações de desidratação das pentoses e hexoses, com a formação de furfural e hidroximetilfurfural. (RAMOS, 2003). A Figura 9 mostra o mecanismo de formação de furfural a partir xilose em meio ácido.

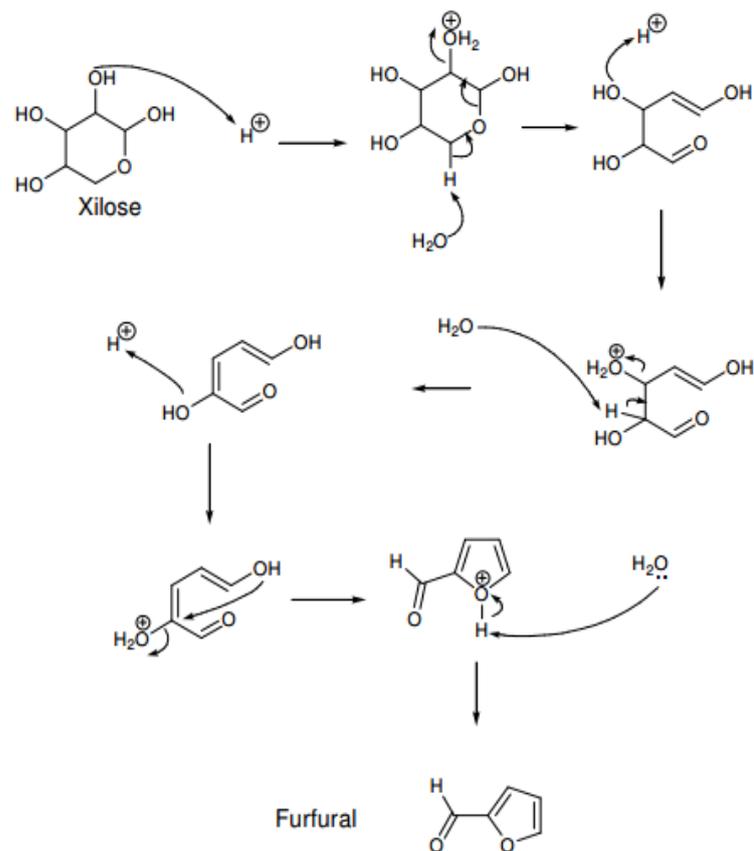


Figura 9 - Mecanismo de desidratação de pentoses em meio ácido, formando furfural. Fonte: Pitarelo (2013, p. 31).

3.3.6 Hidrólise enzimática

Para converter a celulose à glicose enzimaticamente utiliza-se catalisadores denominados celulasas, um grupo de complexo enzimático, cujas enzimas atuam sinergicamente e estão subdivididas em três classes, as quais rompem as ligações glicosídicas das microfibrilas de celulose, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose. (BAUDEL, 2006).

Embora existam muitas bactérias celulolíticas, especialmente os anaeróbios *Clostridium thermocellum* e *Bacteroides cellulosolvens*, que produzem celulasas com altas atividades específicas, estes microrganismos não produzem altas concentrações de enzima, pois possuem baixa taxa de crescimento em celulose. (RABELO, 2010). Dessa forma, a maioria dos estudos sobre produção de celulase comercial está centralizada em fungos filamentosos, dentre os fungos que produzem celulasas estão as espécies *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochaete chrysosporium* e principalmente os pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Schizophyllum*. (OGEDA; PETRI, 2010). De todos estes gêneros, *Trichoderma reesei* é o mais reportado na literatura, possuindo pelo menos cinco tipos de endoglucanases.

As ações dos sistemas celulasicos, são formadas por três componentes enzimáticos majoritários, as endoglucanases, as celobiohidrolases (exoglucanases) e as β -glucosidases. (MALHERBE; CLOETE, 2002). As endoglucanases atuam randomicamente ao longo da molécula de celulose, gerando um decréscimo significativo de seu grau de polimerização criando extremidades livres na cadeia; as celobiohidrolases, cuja ação catalítica é capaz de hidrolisar preparações celulósicas microcristalinas, atuam nas regiões terminais das moléculas de celulose, promovendo a sua despolimerização gradativa através da remoção de unidades de celobiose terminais e finalmente, as β -glucosidases hidrolisam celobiose, produzindo glucose, reduzindo a quantidade de inibidores e açúcares não fermentescíveis na fermentação. (RAMOS, 2003). Estas três classes de enzimas, individualmente, acarretam alterações bastante diferenciadas na estrutura supramolecular da celulose, mas por apresentarem propriedades complementares, descrevem um alto grau de sinergismo (ou ação cooperativa) durante a hidrólise ou sacarificação da celulose.

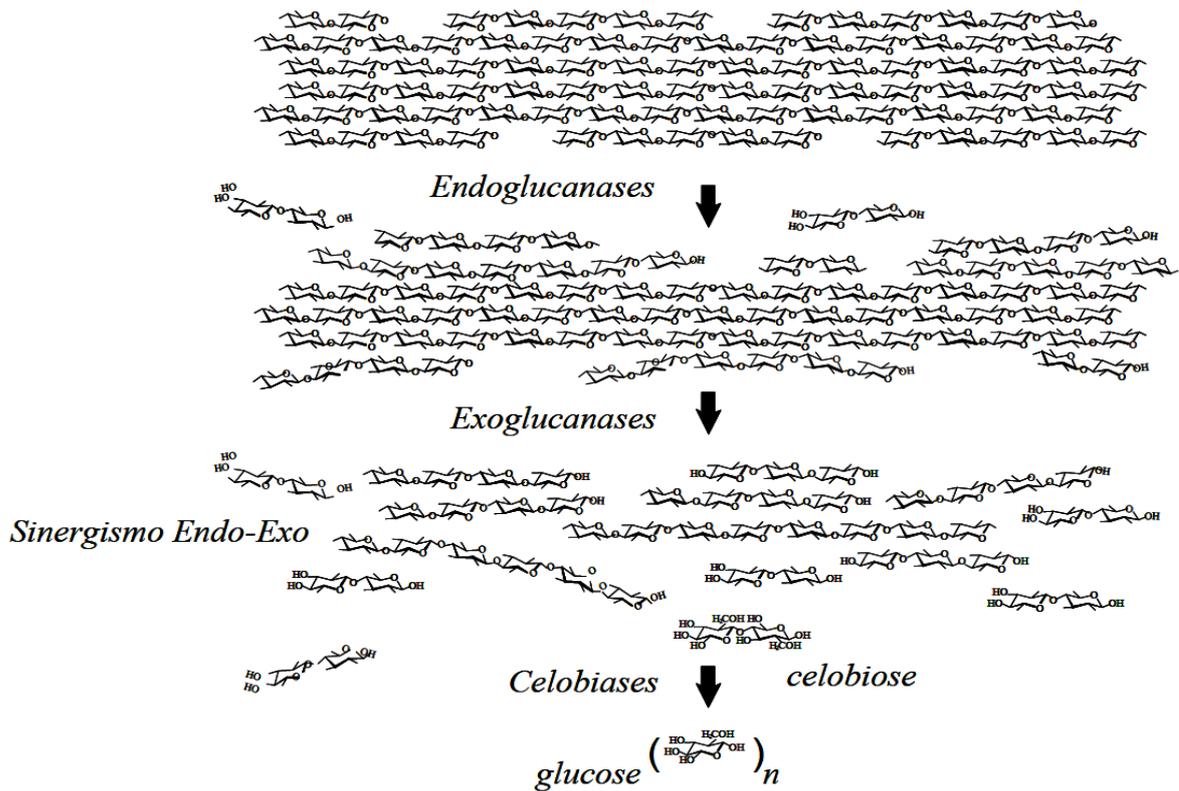


Figura 10 - Representação esquemática simplificada do processo envolvidas na hidrólise enzimática completa de uma das microfibrilas de celulose
Fonte: Pitarello (2007 p. 30).

A Figura 10 ilustra o ataque da Endoglucanases nas regiões amorfas dentro da microestrutura cristalina, criando novos focos de ataque por Exoglucanases nas regiões desestruturadas, e então os dímeros de celobiose são clivados por β -glucosidases para produzir monômeros de glicose, que pode agora ser transportados através da membrana para participar na geração de relações metabólicas no processo fermentativo. (MALHERBE; CLOETE, 2002).

O acúmulo gradativo dos produtos finais da hidrólise enzimática, como a celobiose e a glicose, resulta na inibição da atividade das próprias enzimas do complexo celulásico. Vários métodos têm sido desenvolvidos com o intuito de contornar essa problemática, incluindo a utilização de elevadas concentrações enzimáticas, a suplementação de β -glucosidases durante a hidrólise, bem como a adoção da estratégia de sacarificação e fermentação simultâneas. (SUN; CHENG, 2002).

Dentre os diversos fatores que podem afetar a hidrólise enzimática estão incluídos: tamanho de partícula, porosidade do material, presença de fibras

crystalinas na celulose, assim como presença de lignina e de hemicelulose, as quais dificultam o acesso da enzima à celulose, resultando na redução da eficiência do processo de hidrólise. Neste contexto, a relação sólido: líquido, a atividade das celulasas, as condições de reação (tempo, temperatura e pH), as quais normalmente são amenas, bem como a composição do meio específico e o tempo de fermentação também apresentam grande importância no processo enzimático. (SUN; CHENG, 2002).

A disponibilidade da glicose oriunda da celulose, em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado apresenta-se como um obstáculo no que tange à viabilização econômica da produção do bioetanol proveniente de resíduos lignocelulósicos. Desta forma, hidrólise enzimática se caracteriza como sendo a parte mais crítica do processo, pois esta associada ao rendimento e custo do processo. (BAUDEL, 2006).

Entretanto, a hidrólise enzimática apresenta algumas vantagens em comparação com a hidrólise com ácido mineral diluído, tais como maiores rendimentos de glucose sem a geração de produtos de degradação (furfural e hidrometilfurfural), baixo custo operacional, condições suaves de reação (45-50 °C e pH 4,8) e não apresenta problemas de corrosão nos equipamentos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

Foram utilizado bagaço de cana-de-açúcar, cedido ao centro de tecnologia canavieira (CTC - Piracicaba), pela Usina Açucareira São Manoel (USM), localizada na cidade de São Manuel São Paulo. A coleta do bagaço foi feita em base úmida (logo após a sua moagem para retirada do caldo, direto da bica da saída das esteiras da moenda). O material ficou armazenado em sacos plásticos selados a vácuo para evitar a proliferação de fungos devido a sua alta umidade (50%).

4.1.2 Enzimas

A preparação enzimática empregada para a sacarificação dos substratos pré-tratados foi a Cellic CTec 3® (celulases), fornecida pela Novozymes Latin América (Novozymes, Araucária, Brasil).

4.1.3 Microrganismo fermentativo

As leveduras utilizadas na fermentação dos substratos foram as *Saccharomyces cerevisiae*, do processo fermentativo em produção da Usina Açucareira São Manoel S/A.

4.1.4 Meios de cultura

Também foi utilizado melaço (mel final) proveniente da fabricação de açúcar da USM, para aumentar a quantidade de ART no caldo hidrolisado na fermentação, para uma maior quantidade de etanol no final do processo.

4.2 MÉTODOS

Primeiramente, o bagaço de cana *in natura* foi caracterizado conforme as metodologias descritas abaixo e submetido ao pré-tratamento por explosão a vapor. Todos os substratos obtidos após o pré-tratamento foram armazenados em sacos plásticos, coletado amostras para quantificação de umidade e eficiência do pré-tratamento. As partes que foram utilizadas no experimento foram lavadas com água e filtradas por prensas mecânicas, para separação da fração sólida fibrosa da fração líquida solúvel.

A parte sólida foi submetida a uma etapa de hidrólise enzimática. Foram coletadas amostras periodicamente para avaliar a conversão e eficiência hidrolítica. Após a hidrólise o caldo foi enriquecido com melaço do processo da fabricação de açúcar da USM e fermentado com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* também do processo fermentativo da USM.

4.2.1 Pré-tratamento do bagaço por explosão a vapor

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado em um reator de capacidade de 65 litros, do tipo vaso de pressão automático, com manômetro e termômetro para avaliar condições de operação, válvulas automáticas e painel de controle (FIGURA 11). A pressão é controlada na entrada principal do vapor, cuja injeção no reator é dividida em 3 (três) vias, todas providas de válvulas de alta pressão, o que proporciona uma melhor distribuição do vapor e maior eficiência térmica e, portanto, uma maior homogeneidade durante o pré-tratamento. O reator está acoplado a uma caldeira de alta pressão, um compressor de ar e um ciclone, que é empregado para a descarga do material e escape de vapores.



Figura 11 - Reator de explosão a vapor
Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram pesados 8 Kg de bagaço de base úmida (com umidade em torno de 50%), abastecido o reator previamente aquecido. A válvula superior do reator foi então fechada e as válvulas de admissão do vapor foram imediatamente abertas. A partir deste momento, o aumento da temperatura foi acompanhado até que a temperatura desejada fosse atingida em torno de 195°C. Somente então, a contagem do tempo de pré-tratamento foi iniciada. Ao término do tempo de exposição do material no reator, as válvulas de entrada de vapor foram fechadas e a válvula de esfera (dispositivo mecânico utilizado para controlar o fluxo do material para o coletor), foi imediatamente aberta através de um atuador pneumático para promover a descompressão do material (explosão), o qual foi arrastado para o interior de um ciclone provido de um coletor. Foram realizadas mais duas explosões, só com a injeção de vapor, para garantir a recuperação total do material, que foi então transferido para sacos plásticos mantidos fechados durante o resfriamento para evitar a perda de voláteis. Com o material já na temperatura ambiente, este foi

homogeneizado e uma pequena parte (1 g) foi retirada para determinação de sólidos totais em balança de infravermelho a 125°C até massa constante. Posteriormente o bagaço foi lavado e prensado para separação das partes solúvel da insolúvel.



Figura 12 - Bagaço in natura (A); bagaço pré-tratado explosão a vapor(B).
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.2.2 Hidrólise enzimática

Após o pré-tratamento do bagaço por explosão a vapor, foi realizada a etapa de hidrólise enzimática, na qual a celulose pôde ser convertida a açúcares fermentáveis. Foi feita uma análise do teor de umidade do bagaço pré-tratado (balança infravermelho) para calcular a massa seca o resultado foi de 57% de massa seca. Foram pesados 150g da celulignina pré-tratada e lavada com água destilada e submetida à hidrólise enzimática com uso de enzima comercial Cellic CTec 3 (Novozymes) adicionado 10 FPU/g-cel. ou 1,57 ml de enzima em relação ou substrato seco (biomassa). O ensaio enzimático foi realizado em uma concentração de 10% de solido em pH 4,8 (corrigido de hidróxido de amônio 2M) a 50°C e 150 rpm (rotações por min) por 48 h. A atividade enzimática foi determinada em papel de filtro, como recomendado por Ghose (1987) e expressa como FPU (*Filter Paper Units*) por mililitro da mistura.

A liberação de açúcares durante o processo hidrolítico foi monitorada por analisado biológico (YSI) e cromatografia líquido de alta eficiência (CLAE) (figura), nos tempos de 0, 2, 4, 20, 24, 29 e 48 h, usando um sistema CLAE Alliance e2695 provido de um amostrador automático, desgaseificador de fase móvel, forno de aquecimento de coluna e detectores U.V 2489 e I.R 2414. As análises foram realizada em coluna Aminex HPX-87H e pré-coluna, fase móvel consistindo de H₂SO₄ 0,005 mol.L⁻¹, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e temperatura de 55°C.



Figura 13 - Analisador Biológico YSI; cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE).
Fonte: Agroads (2013) e Waters (2013).

O componente monitorado foi à glicose liberada do processo enzimático e seus valores foram expressos em relação ao seu polissacarídeo de origem (celulose), através da multiplicação do calculo teórico e o numero prático analisou-se o rendimento do processo. Os rendimentos de hidrólise foram então calculados em relação à quantidade de celulose presente no bagaço de cana pré-tratado. Após o tempo de hidrolise enzimática, submeteu-se o resultante a uma filtração onde se separou a parte solida da liquida, a fração liquida foi direcionada para fermentação e a parte solida foi pesada e analisada o teor de umidade.

4.2.3 Fermentação

No experimento de fermentação foi utilizado o caldo hidrolisado proveniente do processo de hidrólise do bagaço pré-tratado após filtração, e melaço proveniente do processo de fabricação de açúcar da USM. Este melaço tem como objetivo aumentar o ART do caldo hidrolisado resultando uma maior quantidade de etanol no final da fermentação. Neste caso, já que o caldo hidrolisado é uma solução rica em glicose e, assim, a quantidade de glicose adicionada no melaço deverá ser computada no cálculo da concentração final do mosto (caldo hidrolisado + melaço). Nota-se que a concentração de açúcar inicial é a soma das frações de glicose, sacarose e frutose medidas no CLAE.

Em geral, os ensaios de fermentação foram realizados em um Erlenmeyer de 1L, com volume de trabalho de 200 mL, volume de mosto (caldo hidrolisado + mel) 130 mL e volume de fermento 70 mL. O mosto, contendo o caldo hidrolisado + melaço (concentração total de açúcares de aproximadamente 150 g/L), previamente preparado, é adicionado à suspensão de células, conforme descrição anterior, e submetido à agitação em mesa incubadora rotativa à 32°C e 120 rpm. Após preparo do mosto, o pH deve ser ajustado em torno de 5,0 utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4) em concentração de 20 %v/v.

A evolução da fermentação foi medida no YSI pela concentração de açúcares ao longo do processo fermentativo (glicose + sacarose). A fermentação é considerada concluída após 8 horas de fermentação e quando pode-se observar que a quantidade de açúcares já chegou ao final.

Finalizada a fermentação, o vinho fermentado é centrifugado por aproximadamente 5 minutos a 3600 rpm. Uma amostra de vinho delevedurado é coletada e estocada em freezer para determinação de carboidratos residuais, etanol, glicerol e ácido acético, mediante análises de cromatografia líquida (CLEA).

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Determinação da massa seca

Uma quantidade conhecida de material celulósico foi colocada em pesa filtro previamente pesado. Este material foi colocado em estufa a 105°C por 2 h para a eliminação da umidade. Logo após, o material foi esfriado em dessecador sob vácuo, pesado e a massa seca foi calculada em relação à massa do material original. A massa seca também foi determinada utilizando uma balança de infravermelho a 125°C até peso constante.

4.3.2 Análise composicional do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi caracterizado, quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina, utilizando a metodologia similar aos procedimentos analíticos laboratoriais do programa de biomassa do Laboratório Nacional de Energia Renovável dos Estados Unidos (NREL).

Esta metodologia é aplicável aos bagaços de cana-de-açúcar “in natura” e pré-tratado (BPT). Em ambos os casos, a amostra é preparada de forma a obter um material isento de sólidos solúveis, com umidade e tamanho de partículas adequados para a análise. A quantidade de sólidos totais do material é determinada para que os resultados sejam reportados com base na quantidade de biomassa seca. Este procedimento utiliza hidrólise ácida em duas etapas com a finalidade de fracionar a biomassa em porções mais facilmente quantificáveis. A lignina é fracionada em material solúvel em ácido e material insolúvel em ácido (Rocha *et al.* 1997). O material insolúvel em ácido inclui cinza e proteínas, as quais são contabilizadas por análise gravimétrica. A lignina solúvel em ácido pode ser quantificada por espectroscopia na região do UV visível. Durante a hidrólise, os carboidratos poliméricos são hidrolisados nas formas monoméricas, as quais são solúveis no líquido de hidrólise. Estes são então mensurados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLEA).

4.3.3 Determinação de sólidos totais

Em um cadinho previamente seco em estufa a 105°C por no mínimo 4h, pesaram-se 2,0 g da amostra (completamente homogeneizada), posteriormente foi levado à estufa (105°C por 4h), esperou-se esfriar dentro de um desecador e obteve-se o primeiro peso (Peso cadinho + amostra seca). O cadinho com a amostra retornou para a estufa a 105°C e secou até obter peso constante. Peso constante é definido como 0,1% de variação na percentagem de peso após 1 h de reaquecimento da amostra. Calculou-se a percentagem de sólidos totais através da seguinte equação:

$$ST (\%) = \frac{\text{Peso}_{\text{cadinho+Amostraseca}} - \text{Peso}_{\text{cadinho}}}{\text{Peso}_{\text{cadinho+Amostraumida}} - \text{Peso}_{\text{cadinho}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

A percentagem de umidade pode ser calculada da seguinte forma:

$$Um (\%) = 100 - \left(\frac{\text{Peso}_{\text{cadinho+Amostraseca}} - \text{Peso}_{\text{cadinho}}}{\text{Peso}_{\text{cadinho+Amostraumida}} - \text{Peso}_{\text{cadinho}}} \times 100 \right) \quad (\text{Eq. 3})$$

4.3.4 Determinação de sólidos solúveis (figura 14)

Adicionaram-se aproximadamente 200 g da biomassa úmida dentro do cesto da centrífuga (cesto da centrífuga vazio, seco e pesado), retiraram-se duas porções em torno de 5 g para determinação de sólidos totais e pesaram-se a quantidade restante (Peso cesto + amostra inicial), aqueceu-se com resistência elétrica 2 L de água dentro de um béquer até 60°C, posicionou-se um béquer de 2 L, previamente pesado (Peso béquer), no local adequado da centrífuga para recolher o líquido centrifugado. Utilizando uma bomba peristáltica bombearam-se os 2000 g de água aquecida (Peso Água), numa vazão de 300 ml/min para dentro da centrífuga, na direção da biomassa dentro do cesto. Após bombear toda a água esperou-se 30 segundos e desligou-se a centrífuga. Pesou-se o cesto da centrífuga com a biomassa lavada (Peso cesto + amostra após remoção dos SS) e tiraram-se duas

porções de 5 g para determinação de sólidos totais. Pesou-se o béquer contendo o líquido centrifugado (Peso béquer + líquido recuperado). Em alguns casos pode ser necessário separar uma amostra deste líquido para posterior análise. Retirou-se toda a biomassa de dentro da centrífuga e acondicionou-se em saco plástico.

Calculou-se a porcentagem de sólidos solúveis (SS) através da seguinte equação:

$$SS (\%) = \frac{\text{Peso}_{\text{Inicial}} \times ST_{\text{inicial}} - \text{Peso}_{\text{após remoção dos SS}} \times ST_{\text{após remoção dos SS}}}{\text{Peso}_{\text{inicial}} \times ST_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

$$\text{Peso}_{\text{Amostra inicial}} = \text{Peso}_{\text{cesto + amostra inicial}} - \text{Peso}_{\text{cesto}}$$

$$\text{Peso}_{\text{Amostra após remoção dos SS}} = \text{Peso}_{\text{cesto + amostra após remoção dos SS}} - \text{Peso}_{\text{cesto}}$$

Calculou-se a perda de massa em porcentagem durante o procedimento de determinação de sólidos solúveis (SS) através da equação seguinte, (perdas altas podem anular o resultado de SS).

$$PM (\%) = \frac{\text{Peso}_{\text{inicial}} + \text{Peso}_{\text{Água}} - \text{Peso}_{\text{após remoção dos SS}} + \text{Peso}_{\text{Líquido recuperado}}}{\text{Peso}_{\text{inicial}} + \text{Peso}_{\text{Água}}} \times 100 \quad (\text{eq. 5})$$

4.3.5 Determinação de carboidratos estruturais e lignina

Pesou-se 0,3000 g da amostra em frasco resistente as condições de autoclave (Peso amostra seca ao ar). Neste mesmo momento pesaram-se duas porções para determinação de sólidos totais (Figura 15), adicionou-se 3,00 mL (ou 4,92 g) de ácido sulfúrico 72% em cada frasco, utilizando bastão de vidro para misturar por um minuto ou até que a amostra estivesse completamente homogeneizada, colocou-se o tubo em banho com água a 40°C durante 60 minutos.

Usou-se bastão de vidro para mexer a amostra a cada cinco minutos sem retirar o tubo do banho. A mistura é essencial para assegurar o contato entre o ácido e as partículas da amostra e garantir uma hidrólise uniforme (Figura 16). Após completar 60 minutos de hidrólise, removeu-se o frasco do banho. (Figura 17) Diluiu-se o ácido até concentração de 4 % adicionando 84,00 g de água deionizada, fechou-se a tampa do frasco fortemente e verteu-se o tubo vigorosamente para eliminar separação de fases entre as camadas de alta e baixa concentração ácida.

Prepararam-se os padrões de açúcares que seriam utilizados para corrigir as perdas devido à degradação durante a hidrólise ácida. A concentração dos padrões pode ser escolhida para ser o mais próximo possível da concentração das amostras de biomassa. No caso do bagaço podem ser utilizados como padrões soluções de 10 g/L de glicose e 5 g/L de xilose e arabinose. Adicionou-se 0,348 mL de ácido sulfúrico 72% em 10 mL da solução padrão dentro do frasco.

Colocaram-se os tubos na autoclave fechados durante 1 h a 121°C. Após completar o ciclo da autoclave, deixou-se resfriar lentamente até temperatura ambiente antes de abrir. (Figura 18). A solução hidrolisada na autoclave filtrou-se a vácuo através do cadinho com meio poroso inicialmente pesado. Recolheu-se o filtrado num frasco apropriado. Esta amostra foi utilizada para determinação de lignina solúvel em meio ácido como também para determinação de carboidratos. A determinação de lignina solúvel pode ser feita até 6 horas após a hidrólise. Se o licor de hidrólise tiver que ser estocado, ele pode ser estocado em refrigerador por no máximo duas semanas. (Figura 19).

Usou-se água deionizada para quantitativamente transferir todo material que permanecer no tubo para o cadinho. Enxaguou-se o sólido com 50 mL de água deionizada. Água quente pode ser utilizada para diminuir o tempo de filtração.

Colocou-se o cadinho com o resíduo insolúvel em meio ácido para secar em estufa a 105°C até peso constante. (peso do cadinho com resíduo insolúvel em ácido seco).

Colocou-se o cadinho com o resíduo seco na mufla a 575 °C durante 3 horas. Cuidadosamente transferiu-se o cadinho da mufla para o dessecador e deixou-se esfriar até temperatura ambiente. Pesou-se o cadinho com a cinza. (Peso cadinho+cinzas).

Transferiu-se 20 mL do hidrolisado obtido na filtração a vácuo da autoclave para um erlenmeyer de 50 mL, usou-se carbonato de cálcio para neutralizar a

amostra (pH 5 – 6) monitorando-se com papel de pH, depois do ajuste do pH entre 5 e 6 decantou-se o material sobrenadante. O pH do líquido após acalmar deve estar próximo de 7 (Figura 20)

Preparou-se a amostra para analisar em CLEA filtrando o líquido decantado através de um filtro com abertura de 2 micras para um frasco apropriado. Se necessário a amostra neutralizada pode-se estocar em refrigerador durante 3 ou 4 dias. Após este período a amostra é comprometida devido ao potencial crescimento de microrganismos. Após resfriar a amostra estocada, observou-se a presença de precipitado, caso positivo precedeu-se à filtração.

Calculou-se o peso seco da amostra inicialmente utilizada, através da seguinte equação:

$$PS(g) = \frac{Peso_{Amostrasecaaoar}(g) \times ST(\%)}{100} \quad (\text{eq. 6})$$

Calculou a percentagem em peso de resíduo insolúvel em ácido (RIA) e lignina insolúvel em ácido (LIA) de acordo com as seguintes equações:

$$RIA(\%) = \frac{Peso_{Cadinho+RIA} - Peso_{Cadinho}}{PS} \times 100 \quad (\text{eq. 7})$$

onde:

$Peso_{Cadinho+RIA}$ = Peso do cadinho + resíduo insolúvel em ácido seco em estufa (g)

PS = Peso seco da amostra (g)

$$LIA(\%) = \frac{Peso_{Cadinho+RIA} - Peso_{Cadinho+Cinzas}}{PS} \times 100 \quad (\text{eq. 8})$$

onde:

$Peso_{Cadinho+RIA}$ = Peso do cadinho + resíduo seco em estufa (g)

$Peso_{Cadinho+Cinzas}$ = Peso do cadinho + resíduo calcinado na mufla (g)

PS = Peso seco da amostra (g)

Calculou-se o percentual de recuperação de cada um dos padrões de açúcares ($R_{açúcar}$) que são utilizados para corrigir as perdas devido à degradação durante a hidrólise ácida.

$$R_{açúcar} (\%) = \frac{\text{Conc. detectada por HPLC (ng/mL)}}{\text{Conc. conhecida do padrão antes da hid. (mg/mL)}} \times 100 \quad (\text{eq. 9})$$

Usou-se o percentual de recuperação de açúcar ($R_{açúcar}$), para corrigir a concentração determinada por CLEA para cada uma das amostras de hidrolisados.

$$C_{corr.açúcar} (\text{ng/mL}) = \frac{\text{Conc. detectada por HPLC (ng/mL)}}{R_{açúcar}(\%)/100} \quad (\text{eq. 10})$$

Calculou-se a concentração dos polímeros (C_{anidro}) a partir das concentrações dos correspondentes monômeros, usando os fatores 0,88 para os açúcares C-5 (Xilose e Arabinose) e 0,90 para os C-6 (Glicose e arabinose):

$$C_{anidro} (\text{ng/mL}) = C_{corr.açúcar} (\text{ng/mL}) \times \text{fator} \quad (\text{eq. 11})$$

Calculou a percentagem dos polímeros através da seguinte equação:

$$\% \text{ Polímero} = \frac{C_{anidro} \times V_{filtrado} \frac{1g}{1000mg}}{PS} \times 100 \quad (\text{eq.12})$$

onde:

$$V_{filtrado} = 87,0 \text{ mL}$$

4.3.6 Determinação de cinzas

Pesou-se 2,0 g da amostra preparada do cadinho, utilizando o bico de bunsen com tripé e tela de suporte. Colocou-se o cadinho sobre a tela em contato com a chama do bico de bunsen até aparecer fumaça e realizar a queima (Figura 21). Resfriou-se o cadinho antes de colocá-lo na mufla.

Colocou-se o cadinho na mufla a 575°C por 24 h. Após resfriamento em dessecador, anotou-se o peso (Peso cadinho+cinzas).

Calculou-se a percentagem de cinzas na amostra através da seguinte equação:

$$Cinzas (\%) = \frac{Peso_{\text{cadinho+cinzas}} - Peso_{\text{cadinho}}}{Peso_{\text{Amostra seca}}} \times 100 \quad (\text{eq. 12})$$

Onde:

$$Peso_{\text{Amostra seca}} (g) = \left(Peso_{\text{amostra}} - Peso_{\text{cadinho}} \right) \times ST(\%) \quad (\text{eq. 13})$$

4.3.7 Figuras ilustrativas

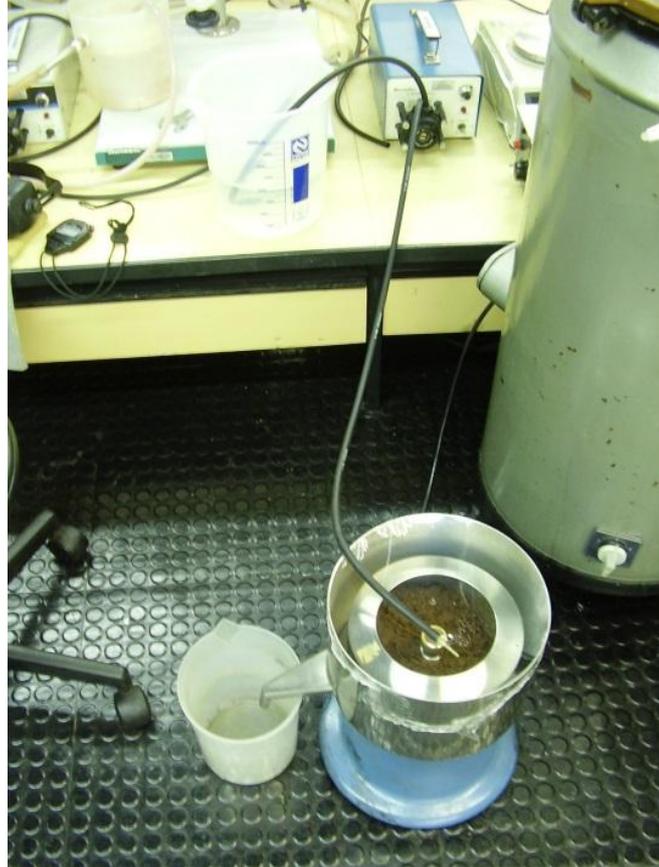


Figura 14 - Determinação de Sólidos Solúveis.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.



Figura 15 - Bagaço preparadas dentro dos frascos para hidrólise.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.



Figura 16 - Hidrólise do bagaço com ácido concentrado 72% a 45°C.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.



Figura 17 – Amostras Bagaço depois da hidrólise autoclave.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.



Figura 18 - Neutralização das amostras com carbonato de cálcio.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.



Figura 19 - Bagaço antes e depois da hidrólise com ácido concentrado.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.



Figura 20 - Filtração do material após hidrólise.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.



Figura 21 - Determinação de cinzas nas amostras de bagaço.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.3.8 Atividade enzimática

As determinações das atividades das celulasas (endo e exoglucanases) e β -glucosidase foram realizadas conforme as metodologias propostas por Ghose (1987).

Foram preparadas, utilizando tampão citrato de sódio 0,05M com pH 4,8, quatro diluições diferentes do extrato enzimático comercial: 1:40, 1:80, 1:100 e 1:160. Uma curva de calibração foi preparada a partir de quatro tubos de ensaio contendo 1 ml de tampão e 0,5 ml de solução padrão de glicose (6,7mg/mL, 5mg/mL, 3,3mg/mL e 2mg/mL). Os tubos de reação foram preparados adicionando 1 mL de tampão, uma fita de papel de filtro Whatman nº 1, 1x6cm (50 mg), e 0,5 mL de extrato enzimático diluído. Para o branco da enzima, foram adicionados em diferentes tubos de ensaio 1 mL de tampão e 0,5 mL das respectivas diluições. Um tubo de ensaio foi preparado com 1,5 mL de tampão e uma fita de papel de filtro, como branco do substrato. Como zero do espectrofotômetro, um tubo com 1,5 mL de tampão foi preparado. Em seguida, os tubos: reacionais, padrões, brancos e zero do espectrofotômetro, foram incubados em banho-maria à 50 °C, por 60 minutos. Passado o tempo de reação, foi adicionado 3 mL do reagente ácido dinitrosalicílico. Todos os tubos foram fervidos por 5 minutos, resfriados em água gelada e adicionou-se 20 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro à 540 nm. Com os resultados de absorbâncias das soluções padrão, foi construído um gráfico de absorbância em função da massa de glicose e obteve-se uma equação usada para encontrar a massa de glicose liberada em 60 minutos. Um novo gráfico, concentração do extrato enzimático em função da massa liberada em 60 min foi feito usando as concentrações que liberaram um pouco menos e um pouco mais que 2 mg de glicose resultando em uma nova equação de reta com a qual foi possível estimar a concentração que liberou 2mg de glicose. O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando a seguinte fórmula: $FPU/mL = 0,37/\text{conc. extrato enzimático}$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS DO PRÉ-TRATAMENTO EXPLOSÃO A VAPOR

Após o pré-tratamento, o bagaço foi caracterizado, e suas composições descritas na Tabela 2. O teor de celulose na fração sólida apresentou um aumento de 70%, enquanto que a xilose diminuiu 97,34% em relação ao bagaço pré-tratado com explosão a vapor como resultado da solubilização da hemicelulose. As modificações químicas que ocorrem no bagaço de cana após o pré-tratamento por explosão a vapor foram avaliadas em relação ao bagaço *in natura*.

Tabela 2 - Bagaço de cana-de-açúcar antes e após tratamento explosão a vapor

Componente	Bagaço in natura	Bagaço Pré-tratado
Celulose	39,27	56,1
Xilose	21,63	4,5
Arabinose	2,51	0
Lignina	23,38	31,7
Cinzas	5,24	6,6
Outros	7,97	98,9

Fonte: Elaborado pelo autor.

A redução das hemiceluloses com relação ao bagaço pré-tratado por explosão a vapor pode refletir em uma melhora na conversão enzimática da celulose já que a hemicelulose forma uma camada protetora ao redor da celulose, reduzindo a eficiência do ataque enzimático. (SOARES, 2013).

O bagaço de cana foi pré-tratado com sucesso por explosão a vapor, cujo foco principal era produzir substratos altamente acessíveis para a hidrólise enzimática com as melhores recuperações possíveis de açúcares fermentescíveis (principalmente glicose).

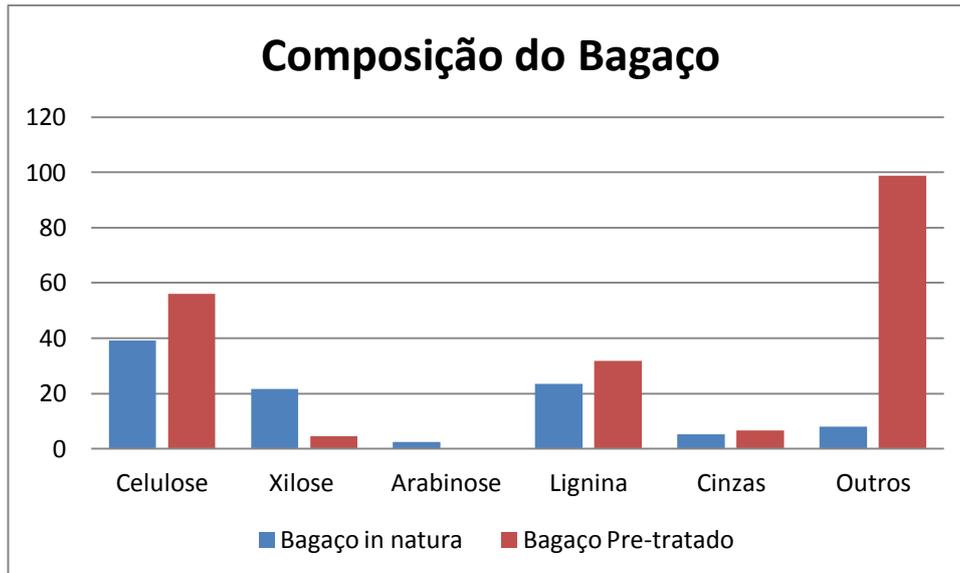


Figura 22 - Bagaço de cana-de-açúcar antes e após o tratamento explosão a vapor.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Observando a Figura 22, pode-se analisar o resultado do pré-tratamento e as mudanças de concentração dos constituintes. Analisando as concentrações de celulose, lignina e outros houve um aumento, estes resultados podem ser atribuídos, principalmente, à remoção das hemiceluloses (xilose e arabinose) após o pré-tratamento, já que o percentual de hemiceluloses foi inferior quando comparado ao bagaço in natura. Isto ocorre porque durante o processo de pré-tratamento por explosão a vapor, todos os componentes da biomassa sofrem hidrólise, mas as hemiceluloses são as mais susceptíveis a este tipo de reação. Sob a ação da temperatura e da pressão do vapor, os grupamentos acetila presentes nas hemiceluloses são hidrolisados a ácido acético e o ácido liberado no meio catalisa a quebra das ligações do complexo lignina-carboidrato, provocando a solubilização de grande parte das hemiceluloses, que passam a ser facilmente removidas por extração aquosa. A fração insolúvel em água contém celulose e lignina parcialmente modificada, sendo que a maior parte desta lignina pode ser removida por extração com álcali, etanol ou dioxano. (PITARELO, 2013).

A presença de lignina no bagaço pré-tratado não impediu o processo de sacarificação da celulose no processo de hidrólise enzimático, este fato pode ser observado com o bom rendimento na hidrólise enzimática, isso para complexo enzimático utilizado neste trabalho.

5.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA

Os substratos pré-tratados e lavados com água foram submetidos a uma hidrólise enzimática de 10% de sólido em pH 4,8 a 50°C e 150 rpm (rotações por min) por 48 h para avaliar a sua suscetibilidade à conversão em açúcares livres pela ação das enzimas. Os resultados obtidos estão descritos na (Tabela 3).

Tabela 3 - Conversão da celulose em glicose

TEMPO (h)	Cglucose YSI (g/L)	Mglucose (g)	Conversão (%)	Glicose no líquido (g)	Conv. no líquido (%)
0	0,7	0,5	0,0	0,4	0,0
2	8,5	4,9	16,4	4,5	14,7
4	11,9	7,1	23,5	6,4	21,1
20	28,0	17,3	57,4	15,6	51,7
24	30,3	18,8	62,2	16,9	56,0
48	41,8	26,1	86,4	23,5	77,8

Fonte: Elaborado pelo autor.

A evolução do processo pode ser observado na liberação de glicose no meio, isso pode ser observado na Figura 23 onde nas duas primeiras horas as conversões foram na casa de 14,7%, nas duas horas seguintes diminuiu para 6,4% e assim continuou diminuindo até o final do tempo de hidrólise que foi de 48 horas.

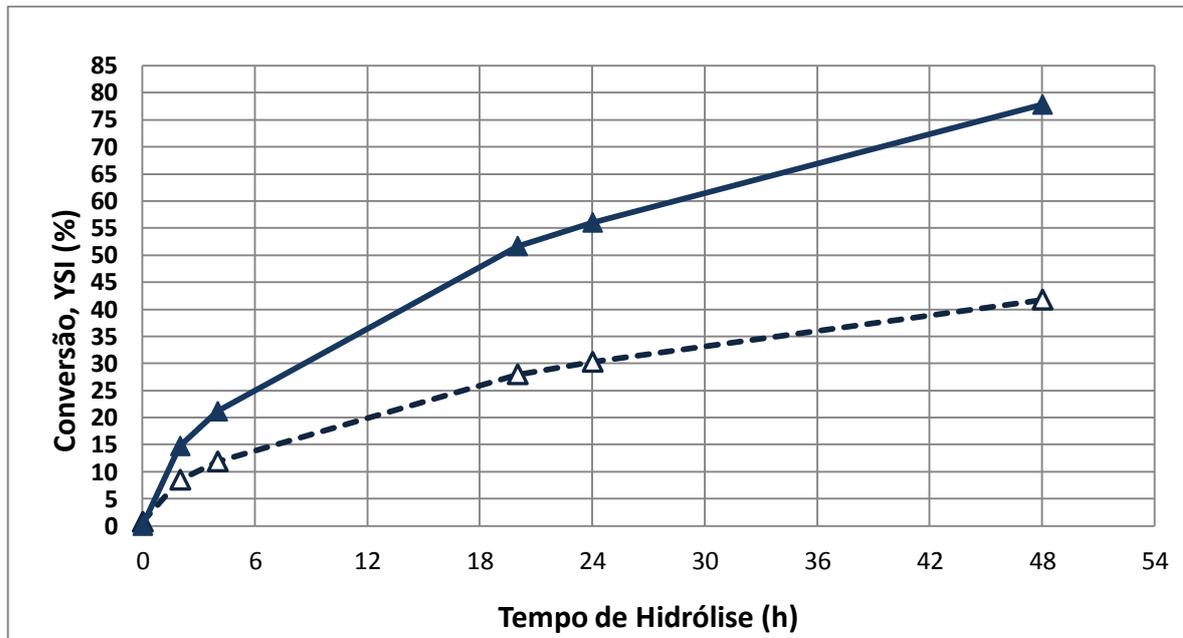


Figura 23 - Gráfico de conversão versus tempo de hidrólise.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na reação abaixo verifica-se o rendimento esperado do processo, onde partimos da fórmula mínima da celulose, chegando a glicose, isso resulta em 62,31g/L de glicose para um rendimento de 100% em 100g de sólido, já que no experimento usamos 150g de sólido com umidade de 57,56% então tínhamos 63,67g de sólido, que resulta em 27,201g de celulose, então para um rendimento de 100% a concentração de glicose no líquido deveria ser de 33,1g/L de glicose. Como na hidrólise enzimática tivemos 23,5g/L de glicose, então o rendimento foi de 77,8%. Podemos considerar que este rendimento foi bom, já que não foi removido lignina do bagaço após o pré-tratamento.



M.M= Cel. 162

M.M= Glic. 180

162/180= 0,90

$$C_c (\%) = \frac{C_g \cdot 0,9}{C_s \cdot T_c} \times 100 \quad (\text{eq.15})$$

Onde:

C_g : concentração de glicose no hidrolisado enzimático (em g/L)

0,9: fator da conversão de celulose em glicose

C_s : concentração da biomassa lignocelulósica no experimento (em g/L)

T_c : teor de celulose na biomassa lignocelulósica (em %)

Durante o processo de hidrólise enzimática, se fez necessário controlar o pH do meio em 4,8, que seria o pH ótimo das enzimas atuantes. Como no pré-tratamento o pH do bagaço após o tratamento fica abaixo de 3,9, então corrigiu com hidróxido de amônio 2M, e partiu com um pH de 5,3, sabendo que a tendência era diminuir. Durante o processo teve a necessidade de corrigir outras vezes.

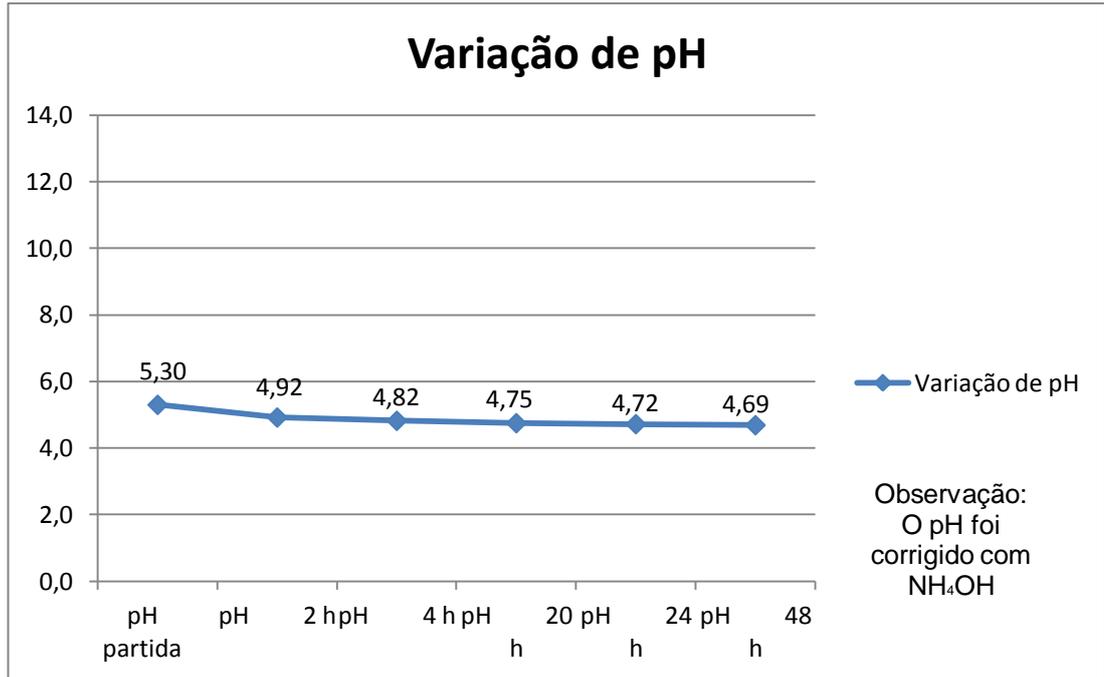


Figura 24 - Gráfico de variação de pH durante o processo enzimático.
Fonte: Elaborado pelo autor.



Figura 25 - Biomassa durante a hidrólise (A); Caldo hidrolisado sendo filtrado (B).
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.3 FERMENTAÇÃO DO CALDO HIDROLISADO

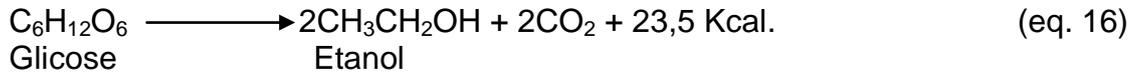
Analisando a tabela 4 abaixo, podemos verificar as conversões, no consumo da glicose para formar do etanol e aumento do glicerol e ácido acético. Vitoretti (2012) comenta que o teor de ácido acético e glicerol está ligado diretamente com o metabolismo da levedura. A produção desses subprodutos implica diretamente na redução da produção de etanol, mas alguns deles são fundamentais para preservar a atividade microbiana. O glicerol, por exemplo, é importante para a manutenção do crescimento da levedura.

Tabela 4 - Resultados da fermentação

AMOSTRAS	GLICOSE	FRUTOSE	GLICEROL	ACETICO	ETANOL	Rendimento
Tempo de 0h	151,89	6,05	0,93	1,53	x	78,28
Tempo de 8h	11,26	6,44	7,99	2,64	56,25	

Fonte: Elaborado pelo autor.

A conversão de glicose a etanol está expressa na reação abaixo.



A fermentação ocorreu em um tempo de 8 horas, saindo de uma concentração de 150 g/L de glicose e chegando no final do processo próximo a zero, este resultado pode ser acompanhado na figura 25.

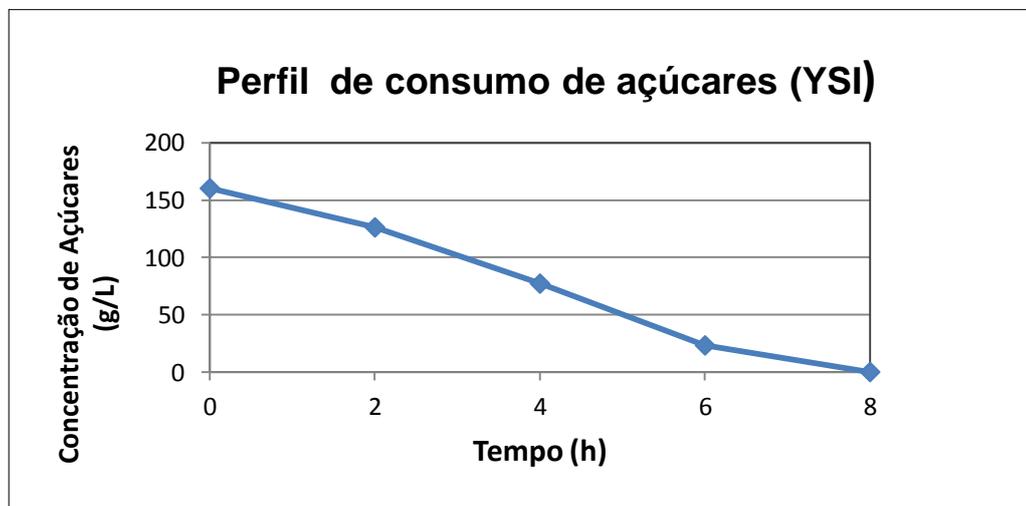


Figura 26 - Consumo de glicose durante a fermentação

A adição do melaço no caldo hidrolisado teve como finalidade, manter a quantidade de ART do meio próximo a de operação de uma escala industrial, contudo somente o caldo hidrolisado proveniente da matéria lignocelulósica não é possível alcançar esta taxa de carboidrato, acrescentando o melaço favorece o suprimento de alguns elementos essenciais às atividades da levedura, estabelecendo assim a concentração do nutriente que aumentou as eficiências de fermentação e de processo.

A determinação da concentração de etanol durante a fermentação alcoólica foi realizada em comparação com o rendimento com base no teórico de 1g glicose para 0,511g de etanol.

Partindo de uma concentração de 151,89 g/L de glicose, subtraindo o residual que não converteu na fermentação, que foi de 11,26g/L, temos 140,63 g/L de glicose para um rendimento de 100% teríamos 71,86 g/L de etanol. Com o resultado de 56,25 g/L de etanol temos um rendimento de 78,28% de conversão.

Eficiência da fermentação (E_f)

$$E_f = \frac{Y_{p/s}^r}{Y_{p/s}^t} \times 100 \quad (\text{eq.17})$$

Onde:

$(Y_{p/s})^r$: rendimento real (em g/g)

$(Y_{p/s})^t$: rendimento teórico (em g/g)

5.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA IN NATURA

O bagaço de cana-de-açúcar foi caracterizado em relação a sua composição química e os componentes macromoleculares foram isolados e analisados a fim de investigar sua natureza estrutural, utilizando técnicas de extração, hidrólise cromatografia e espectrometria. Estes dados foram utilizados para determinar os rendimentos de recuperação e calcular o balanço de massas dos principais componentes presentes no bagaço de cana após o pré-tratamento por explosão a vapor, bem como avaliar as modificações químicas e estruturais de cada componente após o pré-tratamento. (GOUVEIA, 2009).

O teor de cinzas nos bagaços pré-tratado e in natura, foram de 5,24 e 6,6% valores considerado elevado, isto pode estar relacionado com impurezas (terra e fuligem) vindo com a cana e permanecendo no bagaço até após sua moagem, já o bagaço não foi submetido a uma etapa adicional de lavagem com água. Esses tipos de impurezas podem acarretar dificuldades no processamento das matérias lignocelulósicas e problemas mecânicos nos equipamentos.

Para verificar o teor de celulose, lignina e hemicelulose foram utilizado uma hidrólise com ácido sulfúrico e temperatura, onde o tratamento ácido degrada o polímero lignocelulósico liberando não só as hemicelulose e lignina, mas também glicose da degradação da celulose, onde foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O método utilizado determina lignina insolúvel em meio ácido, com isso foi possível determinar a quantidade de lignina total da amostra de bagaço livre de extraíveis (GOUVEIA et al. 2009), onde por cálculos gravimétrico chegou a percentagem em peso de resíduo insolúvel em ácido e lignina insolúvel em ácido.

6 CONCLUSÃO

- A caracterização das composições química do bagaço da cana-de-açúcar *in natura* teve resultado de 39,27% de celulose e passou para 56,1% no bagaço pré-tratado.
- O pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar por explosão a vapor sem adição de catalisador (auto hidrolise) obteve um alto rendimento na remoção das hemiceluloses reduzindo cerca de 97% do total.
- Na hidrolise enzimática foi possível converter 77,8% da celulose em glicose no líquido final.
- Foi possível analisar visualmente as mudanças físico-químicas do bagaço pré-tratado com explosão a vapor pelas mudanças de coloração e aspectos das fibras (redução de tamanho e aumento da umidade).
- Os resultados do rendimento obtido na fermentação do caldo hidrolisado pelas leveduras de processos fermentativos convencionais são possíveis, e estão dentro dos padrões de rendimentos normais de uma fermentação alcoólica.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. V. **Fermentação Alcoólica: ciência e tecnologia**. São Paulo, SP: Fermentec, 2005.
- ARAÚJO, C. Diagnóstico da Situação Atual do Bioetanol no Brasil: impactos socioambientais e novos desafios para as políticas públicas. F. 22. In: ENCONTRO DA ANPPAS, 4., Brasília, DF, 2008. **Anais eletrônicos...** Brasília, DF: [s.n.], 2008. Disponível em: <<http://www.anppas.org.br/encontro4/cd/ARQUIVOS/GT1-237-730-20080509180326.pdf>>. Acesso em: 5 out. 2013.
- ARIN, G.; DEMIRBAS, A. Mathematical modeling the relations of pyrolytic products from lignocellulosic materials. **Energy sources**, Ancara, Turquia v. 26, n. 11, p. 1023-1032, 2004.
- BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in Bioethanol Processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v.34, p. 551-573., 2008. Disponível em: <<http://www.biotek.lu.se/fileadmin/bioteknik/Utbildning/Kurser/KKKA05/ProgressETOHprocess.pdf>>. Acesso: 12 out. 2013.
- BANERJEE. R.; PANDEY, A. Bio-industrial applications of sugarcane bagasse: a technological perspective. **Internacional Sugar Journal**. v. 104, n. 1238, p. 64-67. Londres, 2002.
- BASTOS, V. D. **Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias**, Estudo Setorial, BNDES. n. 25, p. 5-38. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <http://funcex.org.br/material/redemercosul_bibliografia/biblioteca/ESTUDOS_BRASIL/BRA_161.pdf>. Acesso: 16 nov. 2013.
- BAUDEL, H. M., Pré-tratamento e hidrólise. **III Workshop Tecnológico sobre: Hidrólise para produção de etanol**, São Paulo, 2006.
- BENEDETTI, O. I. S.; CHAVES, R. Q.; MAGALHÃES, A. M. **Análise preliminar da produção de etanol a partir de celulose**: caminhos e desafios para a produção de álcool no Rio Grande do Sul. Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia, v. 6, n. 2, p. 272-284. Espírito Santo do Pinhal, 2009. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/661562/1/EABeneditti.pdf>>. Acesso: 10 nov. 2013.
- BON, E. P. S.; FERRARA M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro, RJ: Interciência, 2008.
- BORZANI, W; AQUARONE, E; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial, Vol.3 Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.
- CAMARGO, D. **Aproveitamento das frações hemicelulósica e celulósica dos resíduos de processamento do girassol para produção de bioetanol**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, 2012. Disponível em:

<http://tede.unioeste.br/tede//tde_arquivos/1/TDE-2013-01-28T105513Z-889/Publico/Danielle.pdf>. Acesso: 15 set. 2013.

CARVALHEIRO, F. DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. **Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments**. Journal of Scientific and Industrial Research. v. 67, p. 849-864. Lisboa, Portugal, 2008.

CARVALHO, E. P. Formulação de uma estratégia para garantir o aumento da produção. Rio de Janeiro, RJ, 2006. In: **Seminário** “Uma estratégia para o etanol brasileiro”. Rio de Janeiro: Casa do Brasil. Rio de Janeiro, 2006.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. **Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais**. Química Nova, São Paulo, SP. v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n1/31.pdf>> acesso: 15 nov. 2013.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento**, 2013. 19 f. disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf> acesso: 20 out. 2013.

DENCE, C. W. The determination of lignin. In: **Methods in lignin chemistry**. Springer Berlin Heidelberg, p. 33-61. Berlin, Alemanha, 1992.

DORTA, C. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de Saccharomyces cerevisiae**. 2006. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2006.

CROMATOGRAFIA líquida de alta eficiência. **Waters.com** 2013. Disponível em: <http://www.waters.com/waters/en_US/Alliance-HPLC-System/nav.htm?cid=534293&locale=de_de>. Acesso: 20 nov. 2013

FERREIRA, M. E. S. Estudo da viabilidade da produção de etanol a partir de celulose. **Anais do encontro de iniciação científica-enic**, v. 1, n. 1. Mato Grosso do Sul, 2012.

GÁMEZ, Sara et al. **Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid**. Journal of food engineering, v. 74, n. 1, p. 78-88, 2006.

GHOSE, T. K. **Measurement of cellulase activities**. New Delhi: Indian Institute of Technology. Indian, 1987.

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 1, n. 4, p. 27-33, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n6/26.pdf>>. Acesso: 27 out. 2013.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo, SP: Sarvier, 2000.

LEITE, R. C.; CORTEZ, L. A. B. **O etanol combustível no Brasil. Revista Biocombustíveis no Brasil: Realidades e Perspectivas**, Ministério das Relações Exteriores, 2008. Disponível em: <http://ag20.cnptia.embrapa.br/Repositorio/etanol3_000g7gq2cz702wx5ok0wtedt3xdrmftk.pdf> acesso: 21 nov. 2013.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. *Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher, Vol. 3, 2001.

MACEDO, I. C. **Situação atual e perspectivas do etanol. Estudos avançados**, Química Nova, São Paulo, SP. Vol. 21, n. 59, p. 157-165, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ea/v21n59/a11v2159.pdf>> acesso: 14 nov. 2013.

MARCOCCIA, Renato. **A participação do etanol brasileiro em uma nova perspectiva na matriz energética mundial**. 2007. 95 f. Dissertação (Mestrado em Energia), Escola Politécnica / Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: <http://143.107.4.7/biblioteca/producao/2007/Teses/Dissertacao%20_%20Renato%20_%20Etanol.pdf>. Acesso: 31 ago. 2013.

MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 1, n. 2, p. 105-114, 2002. Disponível em: <[http://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/3611/Malherbe_Lignocellulose\(200\).pdf?sequence=1](http://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/3611/Malherbe_Lignocellulose(200).pdf?sequence=1)> acesso: 14 nov. 2013.

MARQUES, M. O.; MARQUES, T. A.; TASSO JUNIOR, L. C. *Tecnologia do açúcar. Produção e industrialização da cana-de-açúcar*. p. 01-12. Ed. Funep, Jaboticabal SP, 2001.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. **Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 426-432. Matanzas, CUBA, 2007.

MOSIER, N.; ILLELEJI, K. **“How Fuel Ethanol Is Made from Corn.”** ID-328. Purdue University Cooperative Extension Service, 2006. Disponível em: <<http://www.extension.purdue.edu/extmedia/ID/ID-328.pdf>>. Acesso: 20 out. 2013.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova*, São Paulo, SP. v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n7/a23v33n7.pdf>>. Acesso: 31 out. 2013.

ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2503-2510, 2007.

OLIVEIRA, F. M. V. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação na celulose de palha de cana**. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Biotecnologia industrial), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010. Disponível em:

<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97131/tde-27092012-112400/pt-br.php>> acesso: 02 nov. 2013.

OLIVEIRA, T. B. A. et al. Tecnologia e custos de produção de cana-de-açúcar: um estudo de caso em uma propriedade agrícola. **Latin American Journal of Business Management**, v. 3, n. 1, p. 150-172. Taubaté, SP, 2012.

PITARELO, A.P.; SILVA, T. A.; PERALTA-ZAMORA, P.; RAMOS, L. P. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, SP. v. 35, p. 1502-1509, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v35n8/v35n8a03.pdf>>. Acesso: 27 out. 2013.

PITARELO, Ana Paula. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar á bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 2007. 142 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/15870/?sequence=1>>. Acesso: 27 out. 2013.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré- tratamento e hidrolise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2010. Disponível em: <<http://pct.capes.gov.br/teses/2010/33003017034P8/TES.PDF>>. Acesso: 25 ago. 2013.

RAMOS, L. P. A química envolvida no tratamento de vapor de materiais lignocelulósicos. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000600015>. Acesso 22 nov. 2013

ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T.; CURVELO, A. A. S.; ARAÚJO, G. T. **A fast and Accurate Method for Determination of Cellulose and Polyoses by HPLC**. In: Resumos do Fifth Brazilian Symposium on Chemistry of Lignins and Other Wood Components, Curitiba - PR, Brasil, 1997.

ROCHA, G. J. M.; SILVA, J. S. Estudo comparativo de polpas celulósicas obtidas a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por solução ácida e explosão a vapor. In: **XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2006.

ROCHA, G.J.M.; MARTIN,C.; SILVA, V.F.N.; GOMES, E.O.; GONÇALVES, A.R. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 447–452, 2012.

SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; RESENDE, S. T. Potencial da palha da cana-de-açúcar para produção de etanol, Viçosa, MG, **Química Nova**, São Paulo, SP. Vol.35, N. 5, 1004-

1010, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422012000500025&script=sci_arttext>. Acesso: 19 out. 2013.

SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-De-Açúcar: Bioenergia, Açúcar e Álcool – Tecnologias e Perspectivas**: Ed. UFV: Viçosa, MG, 2010.

SARKO, A. **Cellulose- How much do we know about its structure? In Wood and Cellulosic's: Industrial Utilization**. Biotechnology, Structure and Properties. John Wiley e Sons, New York, 1997.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blüncher, v. 2, 2001.

SEABRA, J. E. A. **Avaliação técnico-econômica de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil**. 2008. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000446190>>. Acesso em 13 de out. 2013.

SHIKIDA, P. F. **The Economics of Ethanol Production in Brazil: A Path Dependence Approach**. Retrieved December, v. 29, p. 2010, 2010.

SILVA, V. F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. 116 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena, USP, Lorena, SP, 2009. Disponível em: <http://bd.eel.usp.br/tde_arquivos/2/TDE-2003-03-07T182126Z-129/Publico/BID09005.pdf>. Acesso: 03 nov. 2013.

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

SOARES, M. L. **Efeitos do teor de lignina na sacarificação e fermentação simultânea do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol**. 2013. 68f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia Industrial, Universidade de Pernambuco, Recife, PE, 2013. Disponível em: <http://www.ufpe.br/ppgbi/images/documentos/dissertao_mariana.pdf>. Acesso: 13out. 2013.

UNICA - União da indústria da cana-de-açúcar- **Boletim de notícias**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticias>>. Acessado em: 10/08/2013.

USINA São Fernando. **Composição da cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.usinasaofernando.com.br/conteudo_site.asp?tipoID=3>. Acesso no dia 13/11/2013 às 21h00min

VITORETTI, E. A. **Determinação do ácido láctico ao final do processo de fermentação etanólica e a relação destes teores com a quantidade de bactérias e a viabilidade celular de leveduras**. 2012. 37f. TCC (Bacharel em Química), Universidade do Sagrado Coração, Bauru, SP, 2012.

WANDERLEY, M. C. A. **Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar em batelada alimentada para produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 em processo de SHF**. 2012. 114f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, 2012. Disponível em: <http://www.ufpe.br/ppgbi/images/documentos/dissertao_maria_carolina_wanderley_2012.pdf> acesso: 18 out. 2013.

YSI - Analisador biológico. **Agroads.com** 2013. Disponível em: <http://www.agroads.com.br/analizador-bioquimico-ysi-2900_72447.html> acesso: 20 nov. 2013.

ZHANG, Y. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and bioengineering**, New York, EUA, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004. Disponível em: <http://i-farmtools.iastate.edu/ref/Zhang_and_Lynd_2004.pdf> acesso: 28 set. 2013.

ZHENG, Y; PAN, Z; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, California , USA. v. 2, n. 3, p. 51-68, 2009.