

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE TECNOLOGIA**



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO DA PALHA DE CANA-
DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE
ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

**KELLY CRISTINA NASCIMENTO RODRIGUES PEDRO
PATRYCIA GARCIA DE MELO**

Projeto de Final de Curso

Orientadores

**Prof. Nei Pereira Jr., PhD
Gabriel Jaime Vargas Betancur, DSc**

Agosto de 2010

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Kelly Cristina Nascimento Rodrigues Pedro
Patrycia Garcia de Melo

Projeto Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por :

Andréia Medeiros Salgado, DSc

Roberto Nobuyuki Maeda, MSc

Verônica Ferreira, DSc

Orientado por :

Nei Pereira Jr., PhD

Gabriel Jaime Vargas Betancur, DSc

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Agosto de 2010.

Pedro, Kelly Cristina Nascimento Rodrigues.

de Melo, Patrycia Garcia.

Avaliação do potencial biotecnológico da palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração/ Kelly Cristina Nascimento Rodrigues Pedro e Patrycia Garcia de Melo. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2010.

xii , 81p.; il.

(Projeto Final) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2010.

Orientadores: Nei Pereira Júnior e Gabriel Jaime Vargas Betancur.

1. Palha. 2. Etanol. 3. Hemicelulose. 4 . Celulignina. 5 . Projeto Final. (Graduação - UFRJ/EQ). 6. Nei Pereira Júnior e Gabriel Jaime Vargas Betancur. I. Avaliação do potencial biotecnológico da palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração

“Tornamos o nosso mundo mais significativo pela coragem de nossas perguntas e pela profundidade de nossas respostas”

(Carl Sagan)

AGRADECIMENTOS

Ao professor Nei por ter nos inserido em um campo tão vasto como o da biotecnologia e nos ter dado a oportunidade de trabalhar nele;

Ao Gabriel por muitas vezes ter feito o papel de irmão mais velho e nos chamado à atenção quando necessário;

Ao Luizão pelos momentos de descontração;

A todos do laboratório pelo suporte técnico;

Às nossas mães e familiares pelo carinho e paciência.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Engenharia Química.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Kelly Cristina Nascimento Rodrigues Pedro
Patrycia Garcia de Melo

Agosto, 2010

Orientadores: Nei Pereira Jr., PhD.
Gabriel Jaime Vargas Betancur, DSc.

O desenvolvimento tecnológico tem levado à diminuição das reservas energéticas mundiais, assim como o uso dos combustíveis fósseis vem provocando aumento no aquecimento global. Diante dessa problemática, tem-se apresentado interesse por fontes de energia alternativas e renováveis. A palha de cana-de-açúcar, material lignocelulósico, é um resíduo agrícola abundante no Brasil, e representa uma importante fonte de biomassa (resíduos orgânicos) para a produção de etanol de segunda geração. A palha se converteu em um problema de ordem ecológica, por ter sido queimada indiscriminadamente durante muitos anos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o aproveitamento das frações polissacarídicas da palha gerada na produção de cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração.

Para isso, a fração hemicelulósica foi separada do complexo lignocelulósico, através de um pré-tratamento ácido, que teve suas condições determinadas através de um planejamento experimental, onde se objetivou conseguir o hidrolisado nas condições de melhor concentração de xilose com a menor concentração possível de solução de ácido H₂SO₄. Deste processo, foi obtido um resíduo sólido denominado celulignina, que foi submetido a diferentes metodologias de deslignificação em busca da que melhor se adequasse ao processo denominado SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) onde utilizou-se a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*. Para a fermentação das pentoses obtidas da fração hemicelulósica, foi realizada uma fermentação em batelada utilizando o microorganismo *Pichia stipitis*.

A caracterização da matéria-prima foi realizada pelo método Klason e a determinação da Lignina Ácido Solúvel foi feita através do protocolo da NREL (National Renewable Energy Laboratory).

Foi possível utilizar todas as frações polissacarídicas da palha para a produção de etanol de segunda geração, uma vez que estas forem separadas e processadas de forma diferente. Com a fração hemicelulósica obteve-se uma concentração de 20g/L de etanol, e para o caso do SSF 51 g/L.

IV.1.2 - Teste de lavagem	37
IV.1.3 - Microrganismo	37
IV.1.4 - Manutenção do microrganismo	38
IV.1.5 - Meios empregados para a ativação, propagação e fermentação	39
IV.1.5.1 - Meio de ativação	39
IV.1.5.2 - Meios de propagação celular	40
IV.1.5.3 - Metodologia para a propagação celular	41
IV.1.5.4 - Meios de fermentação	43
IV.1.6 - Fermentação em biorreator	43
IV.1.7 - Amostragem	44
IV.1.8 - Métodos analíticos	45
IV.1.8.1 - Determinação da concentração celular	45
IV.1.8.2 - Determinações quantitativas	45
IV.1.9 - Variáveis de resposta	46
IV.2 - Fração celulósica	47
IV.2.1 - Obtenção da matéria-prima	47
IV.2.2 - Processos de deslignificação	48
IV.2.3 - Pré- hidrólise enzimática	50
IV.2.4 - Preparado enzimático	50
IV.2.5 - Microrganismo	50
IV.2.6 - Processo SSF (<i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i>)	51
IV.2.7 - Caracterização da palha	52
IV.2.8 - Otimização da relação sólido-líquido sobre a palha de cana-de-açúcar deslignificada no processo SSF	54
IV.2.9 - Validação das melhores condições para o processo SSF em biorreator	54
IV.2.10 - Amostragem	55
IV.2.11 - Métodos analíticos	57
IV.2.11.1 - Determinações quantitativas de glicose e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência	57
IV.2.11.2 - Determinações quantitativas de etanol por cromatografia gasosa	57

Capítulo V- Resultados e Discussão	58
V.1 - Fração hemicelulósica	58
V.1.1 - Otimização do processo de pré-tratamento ácido	58
V.1.2 - Teste de lavagem da palha de cana-de-açúcar	64
V.1.3 - Fermentação com o hidrolisado obtido em condições ótimas	65
V. 2 - Fração celulósica	67
V.2.1 - Caracterização da palha de cana-de-açúcar utilizada no pré-tratamento ácido e no processo de fermentação e sacarificação simultâneas	67
V.2.2 - Avaliação do processo SSF (<i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i>)	68
Capítulo VI - Conclusões	72
Referências Bibliográficas	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II.1: Produção tradicional de etanol	5
Figura II.2: Diversidade da indústria alcoolquímica	7
Figura II.3: Ciclo do carbono para combustíveis renováveis	8
Figura II.4: Produção mundial de etanol	12
Figura II.5: Custo mundial de produção de etanol (2008)	12
Figura II.6: Geração brasileira de resíduos agrícolas/agro-industriais	13
Figura II.7: Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico	15
Figura II.8: Fibra de celulose na parede das células vegetais	17
Figura II.9: Alcoóis precursores da lignina	18
Figura II.10: Estrutura típica da hemicelulose	19
Figura II.11: Desenho esquemático do efeito do pré-tratamento para hidrólise da celulose	24
Figura II.12: Atuação sinérgica das enzimas do complexo celulásico	27
Figura II.13: Reação global de conversão de D-xilose a etanol	28
Figura II.14: Reação global de conversão de D-glicose a etanol	29
Figura II.15: Diagrama de blocos do processo SSF	30
Figura II.16: Esquema do processo SSF em biorreator	
Figura IV.1: Fluxograma do processo	34
Figura IV.2: Reator acoplado em prensa hidráulica	36
Figura IV.3: Sistema utilizado para ajuste do pH do hidrolisado ácido	37
Figura IV.4: Levedura <i>Pichia stipitis</i> CBS 5774	38
Figura IV.5: Primeira aclimatação da levedura <i>Pichia stipitis</i>	41
Figura IV.6: Esquema representativo da propagação celular	42
Figura IV.7: Incubação da primeira aclimatação	42
Figura IV.8: Fermentação em biorreator	43
Figura IV.9: Organograma da metodologia de processamento das amostras	44
Figura IV.10: Curva de calibração para quantificação de massa celular	45
Figura IV.11: Palha de cana-de-açúcar logo após sofrer o pré-tratamento ácido	48
Figura IV.12: Sistema reacional utilizado no processo organosolv	49
Figura IV.13: Foto em microscopia eletrônica da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
Figura IV.14: Fermentômetro utilizado no processo SSF	52

Figura IV.15: Biorreator BIOSTAT B (B. Braun International) durante o processo SSF	55
Figura IV.16: Organograma da metodologia de processamento das amostras para dosagem de glicose e etanol em HPLC	56
Figura IV.17: Organograma da metodologia de processamento das amostras para dosagem de etanol em cromatógrafo gasoso	56
Figura V.1: Diagrama de Pareto para determinação do efeito dos fatores do pré-tratamento ácido de palha de cana-de-açúcar sob a concentração de xilose	60
Figura V.2: Diagrama de Pareto do 2º planejamento para determinação do efeito dos fatores do pré-tratamento ácido de palha de cana-de-açúcar sob a concentração de xilose	62
Figura V.3: Superfície de resposta para a concentração final de xilose após pré-tratamento ácido de palha de cana-de-açúcar	64
Figura V.4: Perfil cinético da fermentação das pentoses provenientes da fração hemicelulósica	65
Figura V.5: Perfis cinéticos obtidos para o etanol equivalente dos experimentos utilizando sólidos proveniente de diferentes processos deslignificantes	68
Figura V.6: Perfis cinéticos obtidos para o etanol equivalente dos experimentos em diferentes relações S:L com sólido pré-tratado com NaOH (agente deslignificante)	70
Figura V.7: Perfil cinético do processo SSF realizado em biorreator	71

ÍNDICE DE QUADROS ETABELAS

Tabela II.1: Síntese do panorama mundial	10
Tabela II.2: Resumo das fases do Pró-álcool	11
Tabela II.3: Composição de diferentes tipos de resíduos agro-industriais	16
Tabela II.4: Constituintes básicos de alguns materiais lignocelulósicos	16
Tabela IV.1: Condições utilizadas no 1º planejamento experimental	35
Tabela IV.2: Condições utilizadas no 2º planejamento experimental	35
Tabela IV.3: Composição do meio de manutenção	38
Tabela IV.4: Composição do meio utilizado para a Ativação de células	39
Tabela IV.5: Composição da solução de sais minerais e ácido cítrico	40
Tabela IV.6: Condições operacionais para análise cromatográfica de açúcares e etanol	46
Tabela IV.7: Tipos de deslignificação e condições	49
Tabela IV.8: Condições operacionais do cromatógrafo gasoso	57
Tabela V.1: Matriz experimental e resultados utilizados para o pré-tratamento ácido	59
Tabela V.2: ANOVA com concentração de xilose como variável de resposta	59
Tabela V.3: Valores preditos para maximização da concentração de xilose durante o pré-tratamento ácido de palha de cana-de-açúcar	60
Tabela V.4: Planejamento para o pré-tratamento ácido de palha de cana-de-açúcar em condições mais severas	61
Tabela V.5: Valores preditos para maximização da concentração de xilose no 2º planejamento	62
Tabela V.6: Quantidade de xilose da água de lavagem	64
Tabela V. 7: Teor de celulose, hemicelulose, lignina total e cinzas presente na palha <i>in natura</i> e na palha deslignificada com NaOH 4%	67
Tabela V.8: Resultados finais para pré-hidrólise e SSF de sólidos submetidos a diferentes tratamentos de deslignificação	69
Tabela V.9: Resultado dos experimentos utilizando diferentes relações S:L utilizando NaOH como agente deslignificante	70

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

A utilização desenfreada de hidrocarbonetos como fonte de energia vem se tornando um grande problema, já que esta fonte deriva-se de reservas de petróleo que vem diminuindo ao longo dos anos, o que vem aumentando os custos de produção. Adicionalmente, a queima destes combustíveis fósseis ocasiona danos ao meio ambiente, pois gera um aumento nas emissões de dióxido de carbono, monóxido de carbono, compostos sulfurados e nitrogenados, o que potencializa um aumento no efeito estufa.

Baseado nestas razões surge a necessidade de procurar fontes de energia alternativas e renováveis. Mas, estas fontes de energia têm que se enquadrar em três aspectos: viabilidade econômica, sustentabilidade e disponibilidade para a geração de energia.

Uma das fontes de energia que atendem esses aspectos são as biomassas, que são definidas como toda matéria orgânica renovável, incluindo matéria vegetal quer seja cultivada em terra ou água; produtos animais e esterco; subprodutos de processamento de alimentos e da silvicultura e resíduos urbanos. Tais materiais podem ser obtidos estabelecendo plantações de cultivo para bioenergia ou da origem dos resíduos da lavoura (Schuchardt & Ribeiro, 2000; Lal, 2005).

O uso de biomassas como fonte de energia vem aumentando, mas com esse aumento surge um problema: como aumentar a área agricultável sem competir com a utilização da terra para a plantação de alimentos, lazer, moradia, meios de transporte e reservas de proteção ambiental. (MAPA, 2005; Lal, 2005).

No caso brasileiro há a vantagem de aumentar a área agricultável para a produção de energia sem competir com a área destinada à produção de alimentos, além disso, pode-se considerar a possibilidade de múltiplos cultivos utilizando o sistema de safra e safrinha, ou de cultivo de inverno e duplo cultivo de verão, já que é uma tendência dominante na produção de grãos do país. Por situar-se, predominantemente, na faixa tropical e subtropical do planeta, o Brasil recebe intensa radiação solar ao longo do ano, o que promove uma maior densidade, por unidade de área, da produção de bioenergia (Pereira, 2006).

A energia de biomassas inclui tanto os usos tradicionais (queima para cozimento e aquecimento) quanto os modernos (produção de eletricidade, vapor e biocombustíveis líquidos). Para a consolidação da produção de combustíveis de biomassa e ampliação do espaço destes na matriz energética, devem ser consideradas características importantes como: alta densidade e eficiência energética, custo compatível, portabilidade e garantia de continuidade de fornecimento (Pereira, 2006).

Neste contexto surge o conceito de biorrefinaria, no qual processos biotecnológicos oferecem um grande número de alternativas para a obtenção de diferentes substâncias de interesse industrial que podem substituir os derivados de petróleo. Este conceito baseia-se na utilização de recursos agro-industriais, destacando-se os materiais lignocelulósicos que são compostos por duas frações polissacarídicas: a celulose e a hemicelulose, além da lignina que atua como agente permanente de ligação e estes são utilizados como matéria-prima na produção de biocombustíveis, enzimas e outros produtos. Então, a partir do conceito de biorrefinaria é possível utilizar separadamente estas frações de acordo com o produto de interesse.

Entre os biocombustíveis destaca-se o etanol, que vem sendo utilizado como substituto da gasolina. No Brasil, um dos maiores produtores mundiais juntamente com os Estados Unidos, o etanol é produzido a partir de matéria-prima sacarínea, o caldo de cana, devido ao baixo custo deste processo e a disponibilidade da matéria-prima. Nos Estados Unidos o etanol é produzido a partir de matéria-prima amilácea, o milho, que

precisa de uma etapa de hidrólise preliminar, apresentando um elevado custo, ao ser comparado com o modo de produção brasileira.

Para suprir a demanda mundial pelo etanol, diversas pesquisas sinalizam como promissor o desenvolvimento de tecnologias baseadas na utilização de resíduos agrícolas e agro-industriais como matéria-prima para sua produção (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

Para a utilização desta matéria-prima, são necessárias etapas de pré-tratamentos que promovem a disponibilização de cada uma das frações polissacarídicas presentes no material lignocelulósico. Desta forma, tanto a fração hemicelulósica quanto a celulósica podem ser tratadas separadamente visando a produção de etanol de segunda geração.

Neste trabalho foi avaliada a produção de etanol a partir de palha de cana-de-açúcar utilizando os processos de pré-tratamento ácido, fermentação das pentoses, pré-tratamento alcalino, organosolv e SSF. A relevância deste estudo está na utilização deste material como matéria-prima, já que uma parte do mesmo tem sido deixado nos campos para proteger o solo após a colheita do processo de erosão e a outra tem sido queimada o que vem se tornando um problema de impacto ambiental.

CAPÍTULO II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados os diferentes aspectos teóricos referentes à temática abordada, assim como os avanços na área reportados na literatura e as tendências de cada uma das tecnologias relacionadas com a produção de etanol de segunda geração a partir de materiais lignocelulósicos.

II.1- O etanol

Em termos gerais, o etanol é um líquido incolor e volátil, de odor ardente e característico, facilmente inflamável, de chama azulada que não gera fuligem, e muito higroscópico; sua pureza habitualmente é medida por graus Gay Lussac. No estado desidratado é perfeitamente miscível com substâncias orgânicas ou minerais como ésteres, carburantes e acetonas entre outros. O etanol pode ser comercializado industrialmente de duas diferentes formas:

- Anidro: é bastante caracterizado pelo teor alcoólico mínimo de 99,3° (INPM), sendo composto apenas de etanol ou álcool etílico. É utilizado como combustível para veículos e matéria- prima na indústria de tintas, solventes e vernizes.
- Hidratado: é uma mistura hidroalcolica com teor alcoólico mínimo de 92,6° (INPM), composto por álcool etílico ou etanol. O emprego de álcool hidratado é na indústria farmacêutica, alcoolquímica e de bebidas, combustível para veículos e produtos para limpeza.

II.2- Alternativas para a produção de etanol

O etanol pode ser obtido quimicamente por hidratação do etileno em um processo catalisado por um ácido forte, como por exemplo, o ácido sulfúrico. Os processos químicos mais modernos possibilitam a produção de etanol através da utilização de zeólitas, terra diatomácea ou carvão, ou de sílica aerogel impregnadas com ácido fosfórico ou tungstíco. O etanol também pode ser produzido através da redução química do acetaldeído, numa reação em fase vapor, catalisada por óxido de níquel ou cobre.

Apesar de serem conhecidos os processos químicos de produção de etanol, o processo de fermentação é o mais utilizado por ser este o mais econômico. Essa vantagem deve-se, principalmente, ao grande número de matérias naturais (Amiláceas, celulósicas ou açucaradas) com potencial uso biotecnológico (Schmidell *et al.*, 2001). As principais etapas para a produção de etanol de primeira geração (processo consolidado) apresentam-se na Figura II.1.

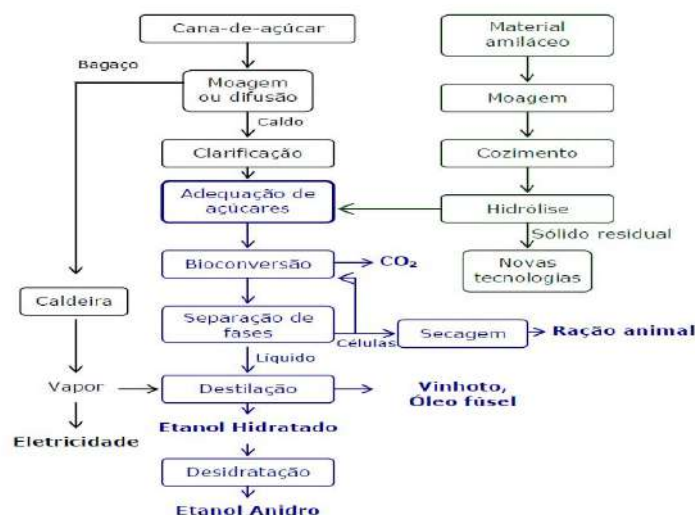


Figura II.1: Produção tradicional de etanol. Fonte: Pereira Jr.(1991).

O novo processo para a obtenção de etanol (ou bioetanol) correspondente a sua fabricação utilizando como matéria-prima as biomassas lignocelulósicas, geradas como resíduos de produtos naturais (sabugo e palha de milho, bagaço, pontas e palhas da cana-de-açúcar) e junto ao conceito de biorrefinarias emergem como peças fundamentais para a expressiva ampliação pretendida da produção de etanol, no caso do etanol de caldo de cana-de-açúcar, que hoje esbarraria em limitações para expansão da área plantada, seja por competir com a produção de alimentos, seja pelo nível de seus preços relativos frente ao petróleo e aos próprios alimentos.

II.3- Aplicações do etanol

O emprego do etanol está centrado na geração energética, em todo o mundo. Na mistura com a gasolina, para a geração de hidrogênio, ou mesmo na utilização direta como combustível. É um composto de extrema importância e possui um papel considerável na matriz energética mundial (UNICA, 2009).

A utilização do álcool etílico é muito mais abrangente do que simplesmente, a produção de energia. Desde a sua descoberta, o álcool esteve ligado à indústria alimentícia, sendo o setor de bebidas alcoólicas responsável pela grande maioria das vendas.

Utiliza-se em diversos segmentos como solvente, componente de formulações médicas, na indústria de higiene e limpeza, alimentícia e muitas outras de origem química, petroquímica ou biotecnológica. Adicionalmente, pode ser utilizado como matéria-prima na produção de ácidos orgânicos, éteres, ésteres, óxidos, hidrocarbonetos, biopolímeros do tipo polihidroxi butirato (PHB), valerato (PHV) e muitos outros (Figura II.2).

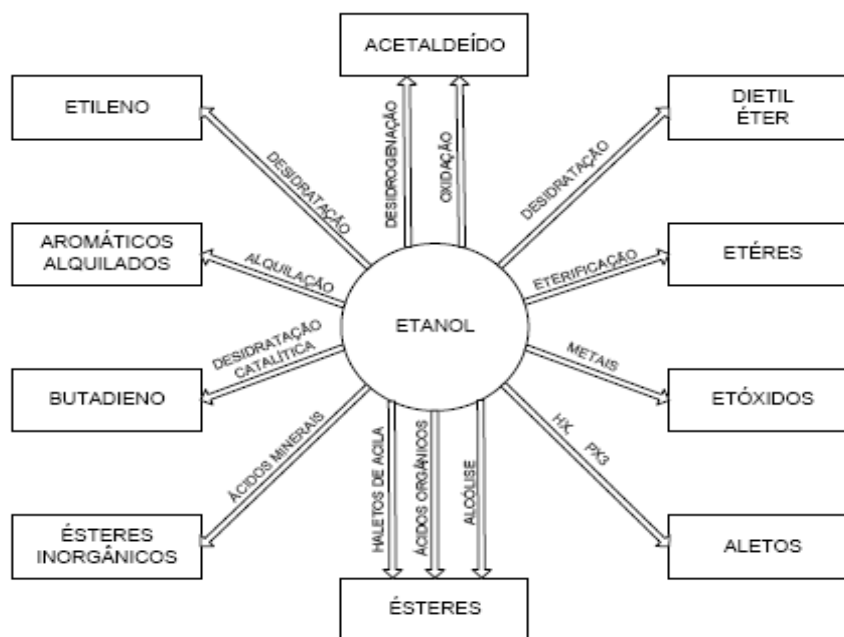


Figura II.2: Diversidade da indústria alcoolquímica. Fonte: Schlitter (2006).

Cabe ressaltar um esforço cada vez maior para o uso do etanol como combustível e como aditivo à gasolina, substituto o MTBE (éter metílico terc-butílico), um oxigenador de origem fóssil usado para aumentar o poder de octanagem da gasolina, que apresentou riscos de contaminação ambiental. Esta tendência justifica-se, tanto pela procura de uma independência dos derivados de matérias-primas fósseis, quanto por questões ambientais, já que o uso de etanol como combustível não representa um aporte na geração de gases do efeito estufa, principalmente CO₂, como esquematizado na Figura II.3.

Estima-se que no futuro a maior parte dos produtos da plataforma petroquímica serão produzidos a partir do etanol, e isto dependerá basicamente de três fatores: redução no custo de produção do álcool, manutenção do preço do barril de petróleo em patamares elevados e a disponibilidade comercial de novas tecnologias direcionadas exclusivamente para o setor (Schlitter, 2006).



Figura II.3: Ciclo do Carbono para combustíveis renováveis. Fonte: International Renewable Energy

II.4- Mercado mundial

Com a crescente demanda por bens de consumo e pela necessidade de locomoção cada vez maior e em um curto espaço de tempo, a necessidade energética elevou-se consideravelmente. Isto tem levado a sociedade a utilizar, cada vez mais, as fontes fósseis. A grande participação dos combustíveis fósseis na matriz energética mundial é a grande responsável pelas intempéries ambientais tão intensamente ocorrentes nos dias de hoje (Bastos, 2007).

Industriais e autoridades políticas estão reconhecendo a importância do cuidado com o meio ambiente, o que em parte vem sendo impulsionado pela sociedade que, cada vez mais, exige políticas e produtos ambientalmente mais amigáveis. Estimulada por

políticas ativas, a produção de etanol tem apresentado forte crescimento nesta década em particular nos Estados Unidos, que em 2005 conseguiu abalar pela primeira vez a posição hegemônica brasileira. Os principais instrumentos utilizados pelos governos para fomentar a indústria do etanol englobam tanto mecanismos de estímulo à produção quanto ao consumo (Bastos, 2007).

Todas as problemáticas descritas anteriormente estão relacionadas ao aumento da demanda energética mundial e ao aquecimento global, têm aumentado o interesse por fontes renováveis de energia. Dentre essas possíveis fontes, as biomassas residuais apresentam potencial para a produção de compostos químicos e combustíveis orgânicos, que, atualmente, são produzidos a partir do petróleo. Para que isso ocorra, deve ser desenvolvida a tecnologia baseada no conceito de biorrefinaria (Wyman *et al.*, 2005). O American National Renewable Energy Laboratory – NREL define biorrefinaria como uma planta industrial que integra os processos de conversão de biomassa para produzir combustíveis, produtos químicos de alto valor agregado e energia.

Na presente década, as atenções não mais se restringem ao etanol combustível, mas incorpora o etanol grau químico, fonte de matérias-primas químicas utilizadas pela indústria de transformação. Isso significa uma redescoberta da alcoolquímica, segmento da indústria química que utiliza o etanol (ou álcool) como matéria-prima para a fabricação de produtos químicos e que perdera espaço no cenário mundial quando da consolidação da indústria petroquímica (INEE, 2009).

Desta forma, observa-se no panorama mundial (tabela II.1) as condições de mercado do etanol para os principais países produtores, destacando-se a liderança dos EUA e o Brasil.

Tabela II. 1: Síntese do panorama mundial. Fonte: Valor econômico (2007)

Panorama mundial				
Produção agrícola e de biocombustíveis				
	Brasil	EUA	UE	
	2006/07	2005/06	2005	
	Etanol	Etanol	Etanol	Biodiesel
Usinas em operação	335	97	32	120
Matérias-primas agrícolas	Cana-de-Açúcar	Milho	Cereais, beterraba, batata, etc.	Óleos de canola, girassol, dendê e soja, gorduras animais, etc.
Áreas cultivadas (milhões de hectares)	6,4	31,6	*Cereais: 51,5 *Beterraba: 2,2	6
Produção de matérias-primas (milhões de t.)	426	267	*Cereais: 253 *Beterraba: 116	19,7
% de matérias-primas destinadas aos biocombustíveis	48%	20%	*Cereais: 1.6% *Beterraba: 0.6%	40% semente de canola
Produtividade agrícola (t/ha)	66,2	8,4	*Cereais: 6.2 *Beterraba: 66	*Semente de canola: 3.4 *Girassol: 1.7
Produção de biocombustíveis (milhões de litros)	17411	18.547	902	4.458
Produtividade (litros/hectare)	6.800	3.000	*Cereais: 3 125 *Beterraba: 7 250	*Semente de canola: 1 999 *Girassol: 833
% de biocombustíveis no consumo de combustíveis fósseis	40%	3,8%	0,60%	2%
Importações (milhões de litros)	--	2.850	250	--
Exportações (milhões de litros)	3.028	--	--	--
Custos de produção (Euro/litro)	0,2	0,3	0,4 - 0,6	0,35 - 0,65
Tarifas	0%	46%	63% / 39%	6,5%

II.5- Brasil: breve histórico

Após a crise no petróleo e a forte queda no preço de açúcar (1974), fez-se necessário estimular a produção de álcool para atender aos mercados interno, visando diminuir a dependência nacional de combustível importado. Desta forma, em 1975 criou-se Programa Nacional do Álcool (Pró-álcool). Neste programa, inicialmente, tornou-se obrigatória a mistura de álcool na gasolina automotiva (aproximadamente 20%). Podem-se citar ainda como outras medidas, os incentivos fiscais para construção de novas unidades produtoras de álcool, a fixação do preço da gasolina em patamar elevado a fim de ser vantajoso o uso do álcool e o esforço da Petrobrás para produzir etanol em todo o país (Schlitter, 2006).

O programa, que pode ser dividido em cinco fases distintas, sintetizadas na Tabela II.2, foi bem sucedido na substituição em larga escala dos derivados de petróleo, sendo responsável pela economia de divisas da ordem de US\$ 11,5 bilhões de dólares no período de 1975 à 2000.

Tabela II.2: Resumo das fases do Pró-álcool

Fases	Período	Considerações
1 – Inicial	1975-1979	Esforço dirigido para se aumentar a produção de álcool anidro, utilizando melão, para misturar na gasolina. Estímulo as refinarias anexas.
2 – Afirmação	1980-1986	A produção alcooleira atingiu, no fim do período, a ordem de 12 bilhões de litros, superando em 15% a meta estabelecida e a proporção de carros a álcool aumentou de 0,46% em 1979 para 76,1% em 1986.
3 – Estagnação	1986-1995	A escassez de recursos para subsidiar os programas de estímulo ao desenvolvimento de combustíveis alternativos resultou em decréscimo nos projetos de produção de energia interna. Essa combinação de desestímulo à produção, incentivo à demanda, fatores de mercado e intervenções governamentais geraram a crise do abastecimento da entressafra de 1989/90, obrigando o Brasil a importar etanol. Em 1990, o programa foi oficialmente extinto pelo presidente Fernando Collor.
4 – Redefinição	1995-2000	Em 1994, o déficit no abastecimento chega a um bilhão de litros. Em fins de 1995, o Governo Federal revê o Proálcool e decide voltar a incrementá-lo, porém esbarra nas montadoras que reduziram a frota a álcool e nos usineiros que preferem produzir açúcar que está em alta. Em 1998, a medida provisória nº 1.662 elevou o percentual de adição de álcool anidro à gasolina, obrigatório em 22% em todo o território nacional até o limite de 24%. Foi estabelecida uma relação de paridade de preços entre o álcool e o açúcar, custeada pela transferência de recursos de outros combustíveis.
5 - Atual	2000- atual	Foi marcada por dois choques do petróleo. O Brasil vive agora uma nova expansão dos canaviais com o objetivo de oferecer, em grande escala, o combustível alternativo. A corrida para ampliar unidades e construir novas usinas é movida por decisões da iniciativa privada, convicta de que o álcool terá, a partir de agora, um papel cada vez mais importante como combustível, no Brasil e no mundo.

Fonte: Schlitter (2006).

II.6- Produção de etanol no Brasil

O Brasil ocupa posição destacada na produção mundial de etanol, sendo o segundo maior produtor de álcool, o maior exportador e o segundo maior consumidor (Infity Bio-energy, 2008) (Figura II.4), confirmando assim, a tradição na cultura de cana-de-açúcar, que representa 12% da produção agrícola nacional. Esta produção, voltada principalmente para a obtenção de etanol e açúcar, é da ordem de 570 milhões de toneladas por ano (Unica, 2009). O etanol brasileiro destaca-se por apresentar o menor custo de produção (Figura II.5).

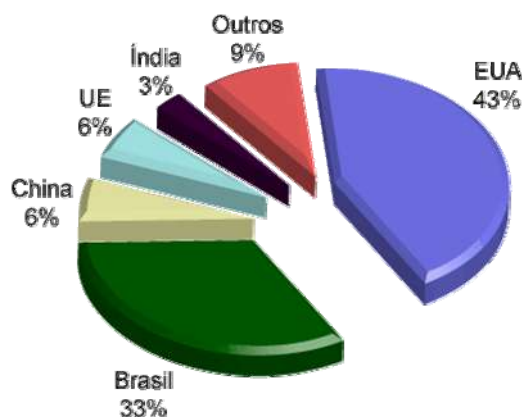


Figura II.4: Produção Mundial de Etanol

Fonte: Infity Bio-energy (2008)

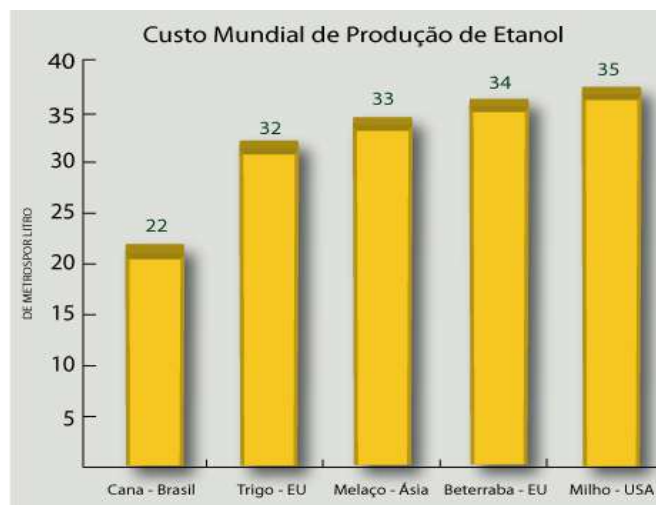


Figura II.5: Custo mundial de produção de etanol (2008)

Fonte: Única (2009)

A grande aposta brasileira, para se aumentar a produção de etanol e manter a liderança mundial, é utilizar biomassas residuais provenientes da produção agrícola e agro-industrial (Figura II.6), dentre os quais podemos nomear o bagaço da cana, sabugo e palha de milho, palha de arroz e trigo, restos de madeira usados na indústria de papel. Entre estes, pode-se destacar o bagaço e a palha gerados do cultivo de cana, os quais são produzidos em uma proporção de 280 kg, cada, para cada tonelada de cana colhida (Única 2005).

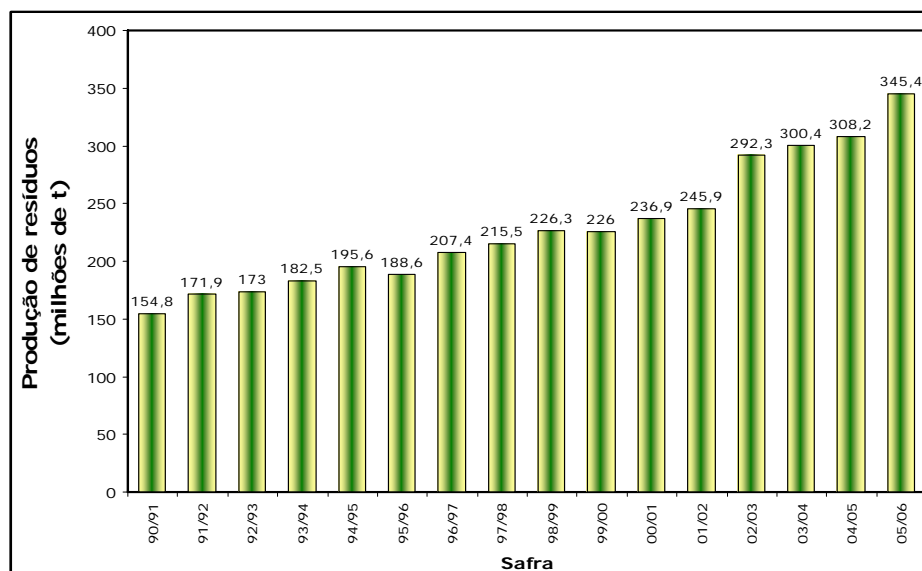


Figura II.6: Geração brasileira de resíduos agrícolas/agro-industriais
 Fonte: CONAB (2006), MAPA (2006); KIM & DALE (2004) e de EIA (2006)

O etanol produzido a partir de lignocelulose é chamado de biocombustível de segunda geração, sendo uma das maiores promessas dentro das tecnologias em desenvolvimento que podem revolucionar o mundo contemporâneo. O material lignocelulósico é composto por celulose, hemicelulose e lignina. Os dois primeiros podem ser transformados em açúcar para, posteriormente, serem fermentados e então gerar etanol em quantidade bastante relevante.

II.7- Vantagens do Brasil no uso de biomassa

Analisando pelo lado de potencial de produção, temos que o setor sucroalcooleiro gera aproximadamente 16 milhões de toneladas de bagaço de cana excedente e 76 milhões de toneladas de palha, cuja utilização permitiria decuplicar a produção brasileira de etanol (Pereira Jr., 2006). A produção brasileira tem ainda o diferencial da integração existente dentro da própria usina – integração da produção, permitindo a redução na emissão de efluentes, a integração energética e de processos, assim como facilitar a logística para distribuição interna e externa, estocagem, transporte e escoamento.

Isso permite atender ao requisito de substancial balanço energético positivo, o que não ocorre hoje, por exemplo, com o milho, que não é auto-energético e exige o uso de combustível fóssil na produção de etanol. No etanol da cana, o bagaço é transformado em energia empregada na própria produção, dispensando energia fóssil. Destacam-se, ainda, outras vantagens como:

- Ser um dos maiores potenciais de biomassas do planeta;
- Possuir uma grande área de expansão de agricultura de energia;
- Ter intensa radiação solar;
- Ter diversidade de clima;
- Possuir exuberância de biodiversidade;
- Água em abundância;
- Pioneirismo na produção de biocombustível em larga escala;
- Elevada geração de empregos;
- Recepção de recursos de investimento do Mercado de Carbono.

II.8.- Materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas basicamente de hemicelulose e celulose, infiltradas por outra estrutura formada por alcoóis aromáticos, a lignina, à qual se encontram unida por ligações de hidrogênio e covalentes (Figura II.7) (Lee, 1997). Em menores proporções, podem ser encontrados, também, taninos, ácidos graxos, fenóis, resinas, compostos nitrogenados e sais minerais principalmente de potássio, magnésio e de cálcio (Shleser, 1994).

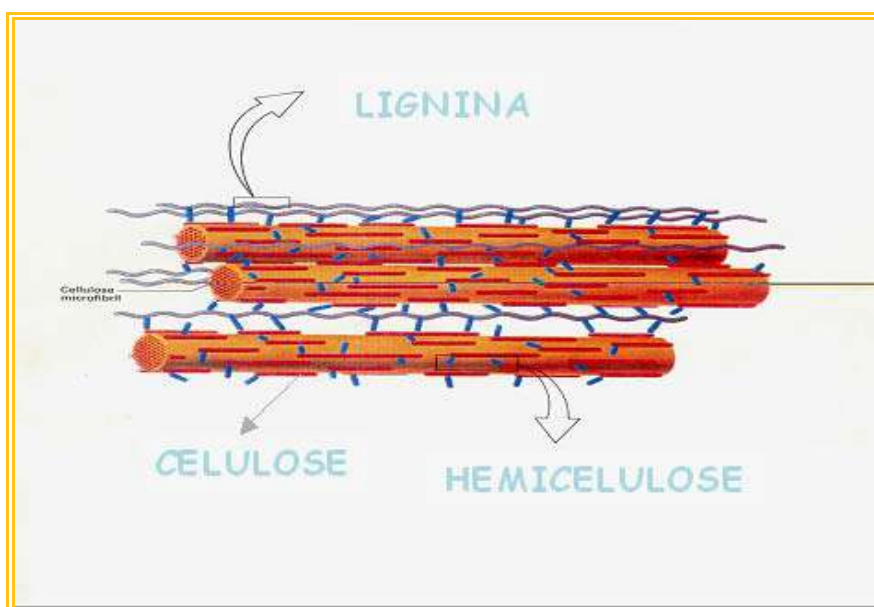


Figura II.7: Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico.

A composição básica do material lignocelulósico depende do vegetal de origem, e no caso de materiais agro-industriais depende também da idade, do período do ano no momento da colheita do material e da região. Na Tabela II.3, apresentam-se algumas fontes de material lignocelulósico e sua composição básica. A composição em glicídeos da hemicelulose e celulose (Tabela II.4) apresentam variações segundo o tipo de material lignocelulósico.

Tabela II.3: Composição de diferentes tipos de resíduos agro-industriais (Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996; Lee, 1997)

Composição	Bagaço de Cana	Palha de Arroz	Palha de Trigo	Sabugo de Milho	Palha de Sorgo	Jornal Impresso	Madeiras
Celulose (%)	33-36	32-37	30-33	34-36	34-36	40-55	~50
Hemicelulose (%)	28-30	19-24	22-28	16-24	45-48	25-40	~20
Lignina (%)	18-20	9-13	14-18	15-19	25-26	18-30	15 -20
Extrativos(%)	4-6	4-5	3-7	2-6	-	-	Até ~10
Cinzas (%)	2-4,8	12-18	3-7	2-4	-	-	Até ~5

Tabela II.4: Constituintes básicos de alguns materiais lignocelulósicos

	Sabugo de Milho	Palha de Trigo	Palha de Arroz	Bagaço de Cana	Semente de Algodão	Jornal Impresso	Resíduos Urbanos
Glicídeos(%)							
Glicose (%)	39,0	36,6	41,0	38,1	20,0	64,4	40,0
Manose(%)	0,3	0,8	1,8	n.d	4,1	16,6	8,0
Galactose(%)	0,8	4,4	0,4	1,1	0,1	n.d.	n.d
Xilose (%)	14,8	19,2	14,8	23,3	4,6	4,6	14,0
Arabinose(%)	4,2	4,4	4,5	4,5	4,3	0,5	4,0
Outros (%)							
Lignina(%)	15,1	14,5	9,9	18,4	17,6	21,0	20,0
Cinzas (%)	4,3	9,6	4,4	4,8	14,8	0,4	1,0
Proteínas(%)	4,0	4,0	n.d	4,0	4,0	n.d	n.d

n.d.-medidas não determinadas. Fonte: Lee (1997)

II.8.1- Celulose

A celulose (Figura II.8) é um homopolissacarídeo linear composto por unidades de β -D-glicose, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ carbono-carbono. É a maior constituinte da parede celular das plantas e uma das estruturas constantemente regenerada durante a fotossíntese. O tamanho da molécula varia dependendo da fonte de

celulose, mas geralmente apresenta entre 8000 e 14000 unidades de glicose, correspondendo a uma massa molecular de cerca de 2,3 milhões de unidades de massa atômica (Shleser,1994).

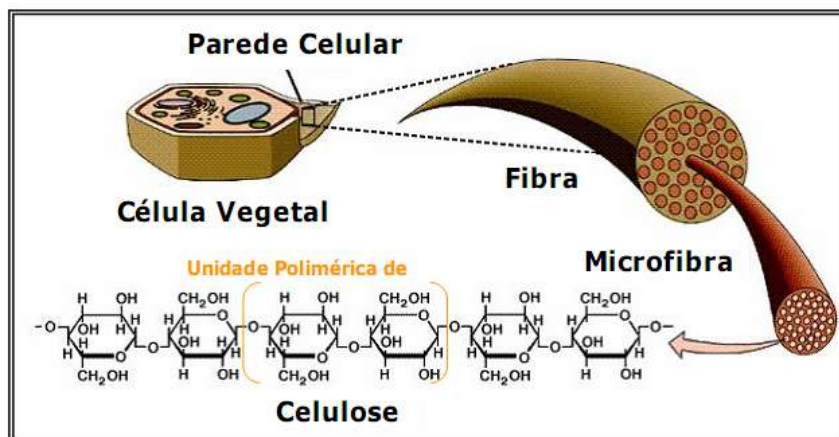


Figura II.8: Fibra de celulose na parede das células vegetais. (Moor, *et al.*,1998)

Nas moléculas de celulose ocorre a formação tanto de ligações hidrogênio intramoleculares (formação de ligação entre unidades de glicose da mesma molécula) quanto de ligações hidrogênio intermoleculares (formação de ligação entre unidades de glicose de moléculas adjacentes). As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez; e as ligações intramoleculares são responsáveis pela formação da fibra vegetal. O alinhamento das moléculas de celulose é responsável pela formação das microfibrilas, e estas se ordenam e formam as sucessivas paredes celulares da fibra.

A dificuldade em hidrolisar a molécula de celulose nativa tem sido o maior desafio para a utilização de materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas. A molécula é resistente à hidrólise, pela sua estrutura cristalina altamente organizada e pela barreira física de lignina que circunda as fibras de celulose. No entanto, existem regiões amorfas, ou não cristalinas, mais suscetíveis à hidrólise. A celobiose é a unidade de repetição do biopolímero da celulose.

II.8.2- Lignina

A lignina é um composto químico que confere rigidez à parede celular e, nas paredes da madeira, age como um agente permanente de ligação entre as células, gerando uma estrutura resistente ao impacto, compressão e dobra. Cabe ressaltar que a lignina quando liberada dificulta os processos fermentativos.

A fração é formada pela polimerização desidrogenativa (iniciada por enzimas) do álcool trans-coniferílico, álcool trans-p-cumarílico e álcool trans-sinapílico (Figura II.9), os quais produzem uma molécula heterogênea, opticamente inativa e com muitas ligações cruzadas. A macromolécula de lignina não pode ser descrita como uma combinação simples de algumas unidades monoméricas, como no caso da celulose e a hemicelulose. Esta dificuldade reside no fato de que a polimerização dos constituintes da lignina apresenta uma alta variedade de ligações (aproximadamente 10 tipos de ligações). A mais importante é β -O-4, que representa 50% das ligações, vista entre as unidades 1-2, 2-4, 4-5, 6-7, 7-8 e 13-14 da molécula (Caramez, 1999; Lemos, 2001).

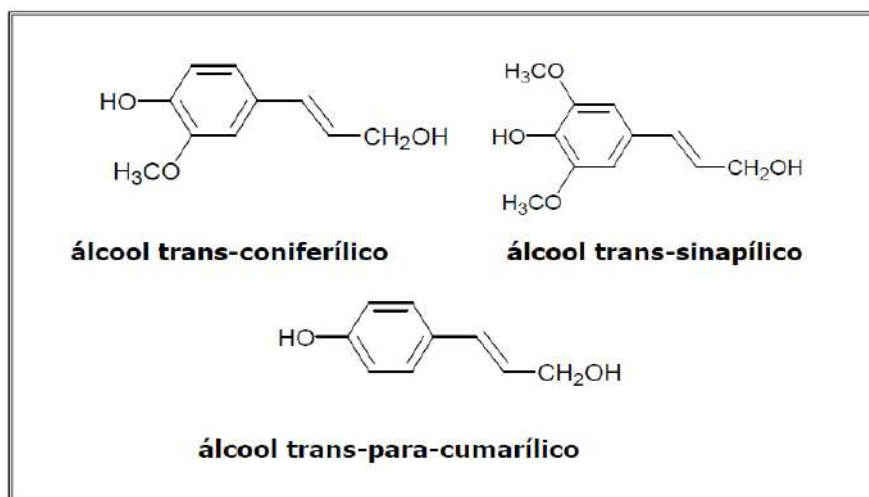


Figura II.9: Alcoóis precursores da lignina. Fonte: D'Almeida (1988)

II.8.3- Hemicelulose

A hemicelulose é uma fração composta de polissacarídeos (Figura II.10) de baixa massa molecular que estão intimamente associados com a celulose nos tecidos das plantas. A hemicelulose é uma macromolécula, em cuja composição podem aparecer condensadas, e em proporções variadas, as seguintes pentoses e hexoses: β -D-manose, β -D-glicose, α -L-arabinose, α -D-galactose e principalmente β -D-xilose, dependendo da origem da matéria-prima. Adicionalmente, podem ser encontrados ácidos como β -D-glucurônico, β -D-galacturônico e α -D-4-O-metilglucurônico, além de alguns grupos acetil (Caraméz, 1999). Esta fração, sem regiões cristalinas devido ao seu grau de ramificação, está constituída, majoritariamente, por uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular como xilanas, arabinanas e mananas, mas podem ser encontrados polissacarídeos mais complexos (Fogel, 2004)

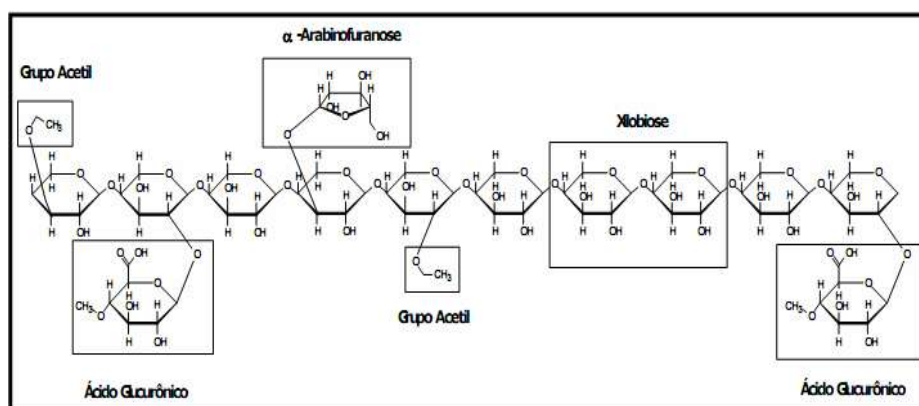


Figura II.10: Estrutura típica da hemicelulose. Fonte: Mussato (2002)

II.9- Palha de cana-de-açúcar

Ao produzir álcool e açúcar, o processamento da cana gera resíduos como o bagaço e a palha. Esta última vem sendo considerada um dos principais resíduos gerados, devido à mecanização da colheita, especialmente no estado de São Paulo, pois

a prática da queima da palha, como método para reduzir os custos de produção, foi proibida pela Lei 11.241 de 19 de setembro de 2002 que determina uma redução progressiva desta prática até a sua eliminação total. Desta forma, a grande disponibilidade deste resíduo agro-industrial tem impulsionado o desenvolvimento de tecnologias que visem o seu aproveitamento mais racional.

A seguir, são descritos alguns dos pré-tratamentos utilizados para o aproveitamento de materiais lignocelulósicos e, conseqüentemente, passíveis de serem aplicados no aproveitamento da palha de cana.

II.10- Tipos de pré-tratamento

O pré-tratamento é um processo que tem como objetivo clivar seletivamente as ligações que unem as macroestruturas, separando assim, as frações lignocelulósicas, adequando a matéria-prima às condições de transformação requeridas para uma ação eficiente dos microrganismos ou enzimas a serem empregados. Os processos de pré-tratamento podem ser classificados como físicos, físico-químicos, químicos e biológicos, conforme o agente que atua na alteração estrutural (Palmqvist & Hahn-Hägerdal 2000, Adsul et al., 2005).

Como pré-tratamentos físicos são conhecidos os processos de pirólise e trituração mecânica. No primeiro, o material é submetido a altas temperaturas para permitir uma hidrólise química posterior. Já o segundo processo é caracterizado pela cominuição do material por fragmentação, moagem ou esfarelamento (Sun e Cheng, 2002).

Os pré-tratamentos físico-químicos são utilizados para aumentar a suscetibilidade do material lignocelulósico ao ataque enzimático. Caracterizam-se pelo

tratamento do material em elevadas pressões e temperaturas, e o posterior resfriamento rápido. Entre os pré-tratamentos deste tipo destacam-se:

- Explosão por CO₂: neste caso, o material é impregnado com CO₂ que se transforma no correspondente ácido e incrementa o processo hidrolítico;
- Explosão a vapor ou auto-hidrólise: neste processo o material é tratado com vapor de água saturado em alta pressão, seguido de uma despressurização quase instantânea, permitindo a solubilização de alguns monômeros e variados polissacarídeos da fração hemicelulósica, a transformação da lignina e o aumento da susceptibilidade da celulose à posterior hidrólise. (Martin *et al.*, 2002 ; Kurabi *et al.*, 2005; Sassner *et al.*, 2006).
- Explosão por amônia: neste caso, o material é impregnado ou embebido numa solução de amônia durante o processo com o intuito de aumentar a taxa de sacarificação da celulose. (Ferrer *et al.*, 2002)

No caso dos pré-tratamentos químicos, as características de cada processo são variadas. Alguns desses processos são descritos a seguir:

- Pré-tratamento ácido: neste processo são utilizados ácidos como catalisadores do rompimento entre as frações, e/ou das próprias frações, em condições que variam desde as mais drásticas, com o objetivo de hidrolisar a celulose, até moderadas, para a solubilização seletiva os monômeros constituintes da fração hemicelulolósica.
- Ozonólise: o ozônio é utilizado neste processo para retirar a lignina do material lignocelulósico, deixando-o mais acessível ao ataque enzimático.
- Pré-tratamento alcalino: a presença de álcalis durante o processo de hidrólise permite a saponificação de ligações éster, que ocorrem entre xilanas e entre xilana e lignina, permitindo a extração de uma parte dessas frações (lignina e hemicelulose), ao mesmo tempo em que é reduzida a cristalinidade das fibras do complexo celulósico.

- Deslignificação oxidativa: Neste processo enzimas peroxidases são utilizadas para biodegradar a lignina em presença de H_2O_2 aumentando a susceptibilidade das fibras a posteriores processos de hidrólises.
- Processo organosolv: Uma mistura de ácido e solvente orgânico, geralmente etanol, é utilizada neste processo para o rompimento das ligações internas da lignina e da hemicelulose.

Nos pré-tratamentos biológicos são utilizados biocatalisadores (enzimas) para clivar seletivamente as ligações presentes no material lignocelulósico. Em outros casos são utilizados microrganismos, principalmente, actinomicetos e fungos basidiomicetos, para a degradação total do material (Sun e Cheng, 2002).

A explosão de vapor, apesar de ser o pré-tratamento mais comum, não atinge os valores de rendimento em recuperação de xilose descritos para o processo de pré-tratamento ácido, que superam 95% (Fogel, 2005). É por essa razão que o pré-tratamento ácido, escolhido para o desenvolvimento do presente trabalho, será descrito com maior detalhe na seqüência.

II.11- Pré-tratamento ácido

Esta técnica é especialmente útil na solubilização e separação da fração hemicelulósica, quando realizada com ácidos diluídos, permitindo, igualmente, o aumento da susceptibilidade da celulose a futuros processos de pré-tratamento sem afetar, de forma notável, sua estrutura base. Esta característica do processo permite a obtenção de hidrolisados com maior conteúdo de xilose em relação a outros glicídeos.

Durante este processo, os catalisadores liberam prótons que clivam as ligações heterocíclicas de éter entre os monômeros das cadeias poliméricas da hemicelulose e no

da celulose, como acontece quando utilizados ácidos concentrados. Nesta clivagem são liberadas diversas substâncias, sendo predominantes xilose, glicose e arabinose. Entre os ácidos utilizados para este tipo de processo encontram-se: H_2SO_4 , HCl , HF , CH_3COOH e HNO_3 (Aguilar *et al.*, 2002; Sun e Cheng, 2002; Cuzens e Miller, 1997; Rodríguez-Chong *et al.*, 2004).

Conhecido como DHR (Dedini Hidrólise Rápida), este processo foi pioneiro no Brasil. Neste pré-tratamento, o bagaço é misturado em contracorrente com solução aquecida de água, ácido sulfúrico e etanol. A solução aquosa separada é, posteriormente, resfriada e neutralizada com cal, precisando ser misturada, devido ao seu alto teor de inibidores, com melaço de cana para sua fermentação a partir de microorganismos geneticamente modificados, pela presença de uma ampla variedade de açúcares (Fairbanks, 2003).

Como desvantagem do processo de pré-tratamento ácido, cabe destacar a formação de inibidores do crescimento celular e da fermentação de xilose. Por exemplo, a presença de hexoses como manose, galactose e glicose, e/ou de pentoses, pode promover uma diminuição na utilização da xilose, por preferência metabólica por esses glicídeos, e ou a inibição das enzimas responsáveis do metabolismo desta pentose. Apesar disso, o consumo de xilose é restabelecido quando esgotados esses glicídeos fermentáveis (Du Preez, 1994). Outros tipos de inibidores podem limitar ou até impedir, o consumo da fonte de carbono e/ou reduzir a cinética de crescimento, prejudicando o desempenho da fermentação. A inibição pode também ser resultado da sinergia entre as várias substâncias presentes no hidrolisado. Entre os inibidores mais comuns destacam-se: ácido acético, furfural, hidroximetil-furfural (HMF) e substâncias fenólicas (Palmqvist *et al.*, 1999).

Além das substâncias provenientes da degradação das frações do material lignocelulósico, alguns íons de metais gerados de corrosão de equipamentos podem ser inibidores. Por exemplo, os íons Zn^{+2} , Co^{+2} e Cd^{+2} são inibidores da enzima xilose

desidrogenase, de destacada importância no metabolismo da xilose (Larsson *et al.*, 1998).

Logo, os métodos para a destoxificação do hidrolisado, a ser utilizado como meio de fermentação, variam de acordo com o tipo de inibidor presente. Entre os métodos mais conhecidos encontram-se mudanças de pH com CaO, Ca(OH)₂, utilização de carvão ativo, colunas de troca iônica, precipitação, extração com solventes orgânicos, evaporação, peneiras moleculares, polieletrólitos e até enzimas (Olsson e Hahn-Hägerdal, 1996; Poutanen *et al.*, 1990; Hahn Hägerdal *et al.*, 1991 e 1998).

II.12- Processos de deslignificação

Estes processos consistem em diminuir o teor de lignina presente em materiais lignocelulósicos para facilitar a posterior pré-hidrólise enzimática pela ação de celulases, tanto pela extração de lignina como pela redução da cristalinidade da celulose, como esquematizado na Figura II.11

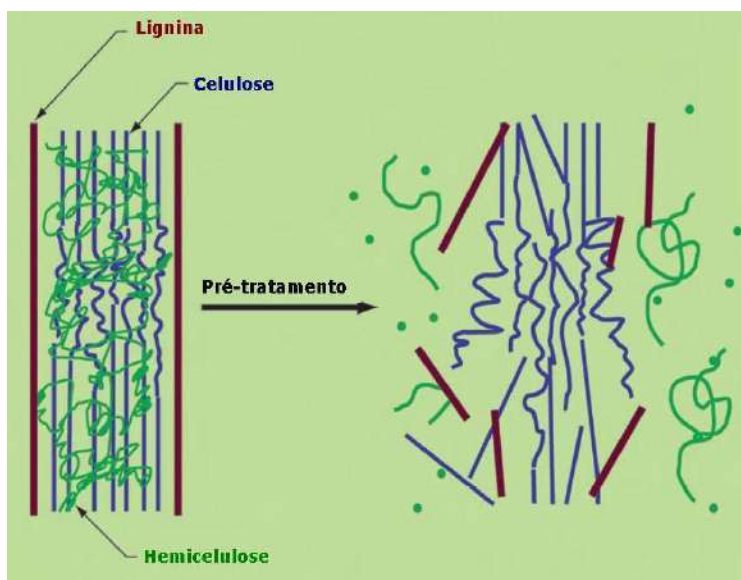


Figura II.11: Desenho esquemático do efeito do pré-tratamento para hidrólise da celulose (Mosier et al, 2005).

A seguir, destacam-se o pré-tratamento alcalino utilizando NaOH, e o processo *organosolv*, utilizados para a realização deste trabalho.

II. 12.1-Pré-tratamento alcalino utilizando NAOH como agente deslignificante

Consiste de um pré-tratamento termo-pressurizado, aplicado em materiais lignocelulósicos, no qual o sólido entra em contato com uma solução de hidróxido de sódio em condições de severidade variada, como reportado por Menezes e Aguiar (2002). O principal efeito deste pré-tratamento é a remoção de lignina da biomassa, promovendo uma maior reatividade da fibra e causando um “inchamento” (*swelling*) da biomassa, pela redução da cristalinidade da celulose, assim como, um incremento da superfície específica de contato e da porosidade da mesma (Pan *et al.* 2005). Baudel (2006) evidenciou a cisão das ligações lignina-carboidrato, além da fragmentação da estrutura da lignina. Com a aplicação destes pré-tratamentos minimiza-se, adicionalmente, a adsorção improdutiva das enzimas à lignina (Yang et al, 2002).

II. 12.2 Processos organosolv

Estes processos, originários da indústria da celulose, empregam solventes orgânicos recuperáveis, capazes de remover a lignina. Apresenta-se como vantagem a redução do emprego da soda cáustica como agente deslignificante. Os processos baseiam-se no cozimento da biomassa lignocelulósica com o solvente *organosolv*, na aplicação de elevada temperatura e pressão para a posterior recuperação da celulose e da lignina. O solvente orgânico é removido e recuperado por evaporação e destilação, sendo reciclado no processo. Este tratamento é eficiente para a remoção da lignina, pois gera uma celulose muito susceptível a etapa de pré-hidrólise enzimática (Ereno, 2007).

II.13- Pré-hidrólise enzimática

Durante a hidrólise enzimática de celulose, ocorrem basicamente dois fenômenos: a adsorção das celulasas na superfície do substrato celulósico e a hidrólise da celulose em açúcares fermentáveis. Assim, a celulose decompõe-se pela ação das celulasas em moléculas de glicose que serão utilizadas, posteriormente, pelo microrganismo no processo de fermentação. As celulasas são enzimas que hidrolisam as ligações β (1,4) da celulose e atuam como um sistema multicomponente na sua degradação, formado por três grupos de enzimas: endoglucanases, exoglucanases e celobiasas. As endoglucanases agem diretamente sobre a celulose amorfa produzindo, aleatoriamente, oligômeros de até 6 unidades de glicose. As exoglucanases ou celobiohidrolases atuam sobre os extremos da celulose cristalina produzindo, principalmente, celobiose e glicose. Finalmente, a celobiose formada é hidrolisada a glicose pela ação das celobiasas ou β -glucosidases (Lynd *et al.*, 2002). As enzimas do complexo celulásico apresentam um efeito sinérgico (Figura 2.12), ou seja, o rendimento apresentado ao atuar conjuntamente é maior à soma dos rendimentos ao atuar isoladamente. São reportadas três formas de sinergia (Lynd *et al.*, 2005, Lynd *et al.*, 2002; Bhat & Bhat, 1997):

- Sinergia entre as Endoglucanases (EG) e as Exoglucanases (ExG): as endoglucanases atuam nas regiões amorfas da fibra, disponibilizando terminais redutores (R) que são hidrolisados pela para atuação das celobiohidrolases (CBH I) e terminais não redutores (NR) que são hidrolisados pelas as celobiohidrolases (CBH II);
- Sinergia entre as Exoglucanases (ExG): as CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação das endoglucanases (EG).;
- Sinergias entre as Exoglucanases (ExG) e as β -glucosidades (BG) e entre as Endoglucanases (EG) e as β -glucosidades (BG): as celobiohidrolases e

endoglucanases liberam como produtos de hidrólise, celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para as β -glucosidases.

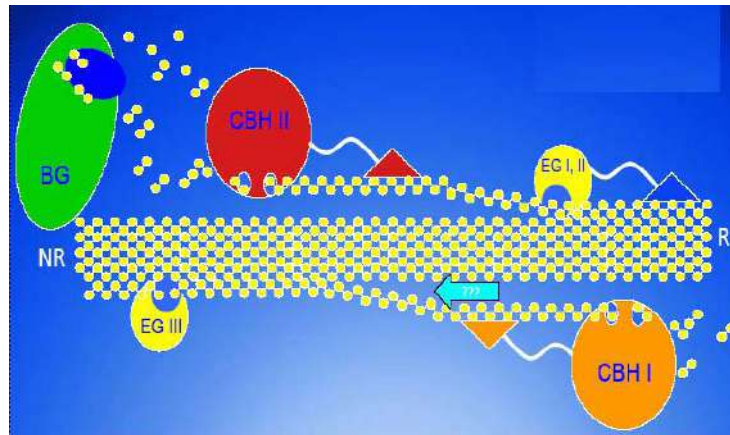


Figura II.12: Atuação sinérgica das enzimas do complexo celulásico (Rad & Yazdanparast (1998).

Diferentes fatores podem influenciar o rendimento da pré-hidrólise enzimática, e dentre eles podem-se citar:

- Temperatura e pH;
- Teor de sólido;
- Relação enzima-substrato.

II.14- A fermentação das pentoses

No processo de fermentação, a D-xilose pode ser degradada visando à produção de etanol por diferentes tipos de bactérias, fungos filamentosos e leveduras naturalmente ocorrentes e/ou recombinantes (Olsson e Hahn-Hägerdal, 1996). Dentre estas, destaca-se a *Pichia stipitis* por ser uma das melhores produtoras de etanol e, adicionalmente, ser altamente flocculante, característica vantajosa para processos em escala industrial (Pereira Jr., 1991).

A conversão estequiométrica de xilose em etanol pode ser expressa pela reação química apresentada na Figura II.13. Para cada 3 moles de xilose são produzidos 5 moles de etanol, acompanhado do desprendimento do mesmo número de moles de CO₂. Sob estas proporções, pode-se considerar um rendimento máximo teórico de 0,51 g de etanol por cada 1 g de xilose. Este rendimento não pode ser alcançado porque parte do substrato é desviado para o crescimento e manutenção da célula e para a formação de outros compostos intrínsecos ao metabolismo.

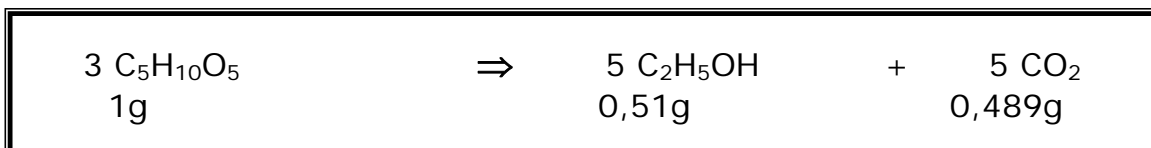


Figura II.13: Reação global de conversão de D-xilose a etanol.

Além de escolher um microrganismo apropriado para o processo de fermentação, é crucial determinar as condições de fermentação que permitam obter os melhores resultados. São citados, a seguir, alguns dos parâmetros relevantes ao processo de fermentação alcoólica a partir de xilose:

- Grau de aeração;
- pH do meio;
- Temperatura;
- Concentração de substrato;
- Concentração de etanol.

II.15- A fermentação das hexoses

Para que seja possível a fermentação da D-glicose nos materiais lignocelulósicos é necessário que a celulose sofra uma pré-hidrólise enzimática que irá liberar a glicose. Esta pode ser degradada por diferentes tipos de bactérias, fungos filamentosos e leveduras visando à produção de etanol. Dentre as leveduras destaca-se a *Saccharomyces cerevisiae* por ser uma das melhores produtoras de etanol.

Para cada mol de glicose são produzidos dois moles de etanol, acompanhado do despreendimento do mesmo número de moles de CO₂. A conversão estequiométrica da glicose em etanol pode ser expressa pela reação química apresentada na Figura II.14. Ocorre o mesmo que na fermentação das pentoses já que o rendimento máximo teórico não pode ser alcançado. Mas esta perda de rendimento pode ser minimizada pela utilização de fermentômetros, visto que os mesmos evitam a entrada de ar no sistema que desloca o equilíbrio no sentido da produção de etanol.

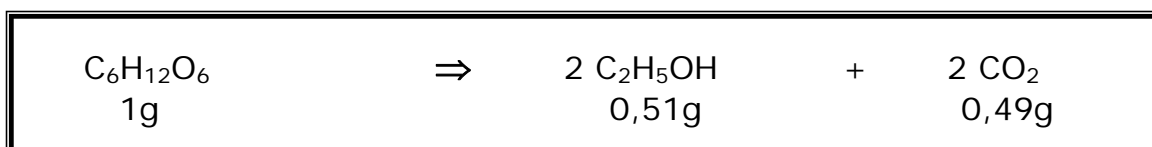


Figura II.14: Reação global de conversão de D-glicose a etanol.

Os parâmetros relevantes ao processo de fermentação alcoólica a partir da glicose são os mesmos apresentados para o processo de fermentação alcoólica a partir de xilose.

II.16- Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)

A sacarificação e fermentação da fração celulósica pode ser conduzida em uma única etapa, sendo realizada enzimaticamente a pré-hidrólise da celulose, evitando a formação de inibidores, e possibilitando o sinergismo com o microrganismo que irá realizar o processo de fermentação.

O microrganismo, ao consumir esta glicose, impede ou reativa o processo enzimático, que é inibido pelos produtos de hidrólise, ao tempo que é obtido o produto desejado no processo (Wingren *et al.* 2003; Sivers e Zachhi 1996). Na Figura II.15, apresenta-se o processo SSF, como diagrama de blocos, enquanto na Figura II.16 apresenta-se, esquematicamente, a sinergia existente entre as enzimas e os microrganismos durante o processo SSF.

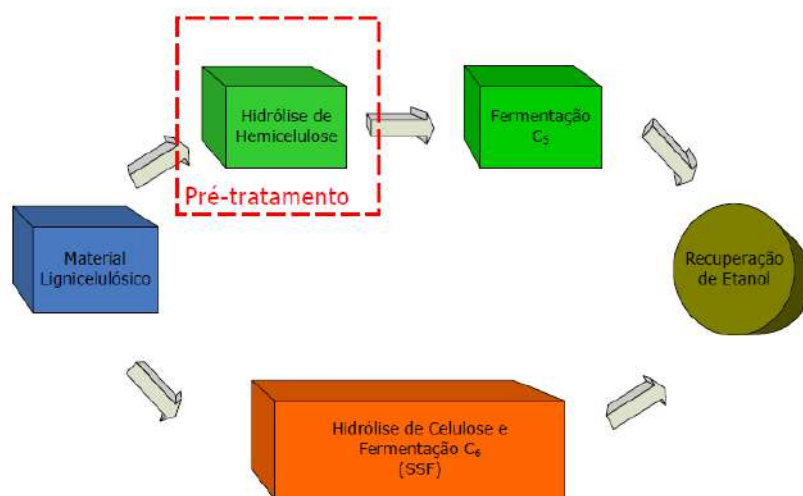


Figura II.15: Diagrama de blocos do processo SSF. Fonte: Vásquez (2007)

Algumas das principais características deste processo são:

- A minimização dos riscos de contaminação, devido às baixas concentrações de açúcar livre no meio;

- O alcance de maiores índices de conversão a glicose, pois os equilíbrios das reações enzimáticas são deslocados no sentido de formação de mais produto, visto que a glicose é concomitantemente consumida;
- O desfavorecimento da cinética enzimática, enquanto ao rendimento de hidrólise na temperatura ótima da enzima (47°C), pela necessidade de condução do processo em condições compatíveis com as de crescimento da linhagem fermentativa da glicose.

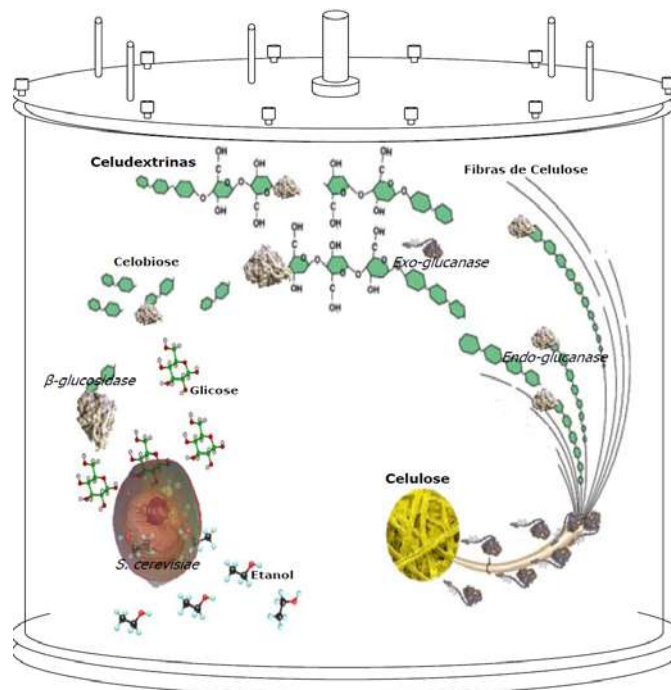


Figura II.16: Esquema do processo SSF em Biorreator (Vásquez,2007).

CAPÍTULO III- JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

III.1-Justificativa:

O retorno ao aumento do preço do petróleo, as perspectivas de esgotamento de fontes fósseis, os riscos geopolíticos da dependência do petróleo, cujas reservas conhecidas estão predominantemente localizadas em regiões politicamente “instáveis”, e compromissos mais sólidos com as questões ambientais têm levado as fontes renováveis a constar de forma definitiva das agendas e políticas públicas de praticamente todos os países, em especial os desenvolvidos (Bastos, 2007).

Por essas razões, o mundo está cada vez mais voltado para fontes renováveis de matérias-primas e energia, e particularmente para o etanol, que desperta de modo crescente a atenção de pesquisadores, empresas e governos. Isso decorre das pressões de preços e perspectivas de esgotamento das fontes não-renováveis de combustíveis fósseis, assim como de preocupações de natureza ambiental, relacionadas à emissão de substâncias que comprometem o meio ambiente. As ações governamentais dirigidas ao etanol orientam-se inicialmente por preocupações na área de energia e combustíveis (Bastos, 2007).

O estabelecimento de metas extremamente ambiciosas para atender ao aumento do consumo do etanol nos próximos anos requer um incremento substancial na sua produção e, nesse sentido, estimula-se a pesquisar e o desenvolver processos utilizando novas matérias-primas para a produção etanol, especialmente, as biomassas lignocelulósicas.

O Brasil destaca-se, uma vez que se encontra na liderança do *ranking* mundial de produtores de cana-de-açúcar e suas respectivas commodities (álcool e açúcar), e cujo parque sucroalcooleiro gera, anualmente, milhões de toneladas subprodutos. A

palha, um destes subprodutos, requer um destino apropriado e isto cria um ambiente técnica e economicamente favorável para a pesquisa e desenvolvimento de processos de reaproveitamento desta matéria-prima abundante. É neste conceito que se realiza este projeto final, visando estudar o aproveitamento integral da palha para a produção de etanol de segunda geração.

III.2-Objetivos:

O objetivo deste trabalho foi avaliar o aproveitamento integral das frações polissacarídicas da palha, sendo esta gerada na produção de cana-de-açúcar, como matéria-prima potencial para a produção de etanol de segunda geração.

Para alcançar os objetivos almejados, foi necessário executar os objetivos específicos:

- Caracterizar, enquanto seu teor em celulose, hemicelulose e lignina, a palha de cana-de-açúcar, assim como a celulignina deslignificada;
- Aperfeiçoar as condições de pré-tratamento ácido da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar visando à obtenção do hidrolisado com alto teor de xilose;
- Avaliar a eficiência do processo de extração do hidrolisado ácido;
- Avaliar a fermentabilidade do hidrolisado obtido em biorreator instrumentado;
- Estudar diferentes metodologias de deslignificação e selecionar a que melhor se adéque ao processo denominado SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*);
- Realizar um estudo sobre a melhor relação sólido:líquido para o processo SSF;
- Validar as melhores condições encontradas na deslignificação de palha de cana-de-açúcar ácida aplicando-se a melhor relação sólido:líquido para o processo SSF em biorreator instrumentado.

CAPÍTULO IV- MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados para o desenvolvimento da pesquisa, assim como as diferentes metodologias aplicadas nos experimentos realizados. Foram estabelecidos: condições para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico, técnicas e condições de deslignificação, processo SSF, manutenção e manipulação do microrganismo utilizado e características dos processos de fermentação. Encontra-se abaixo, um fluxograma (figura IV.1) que ilustra o processo como um todo.

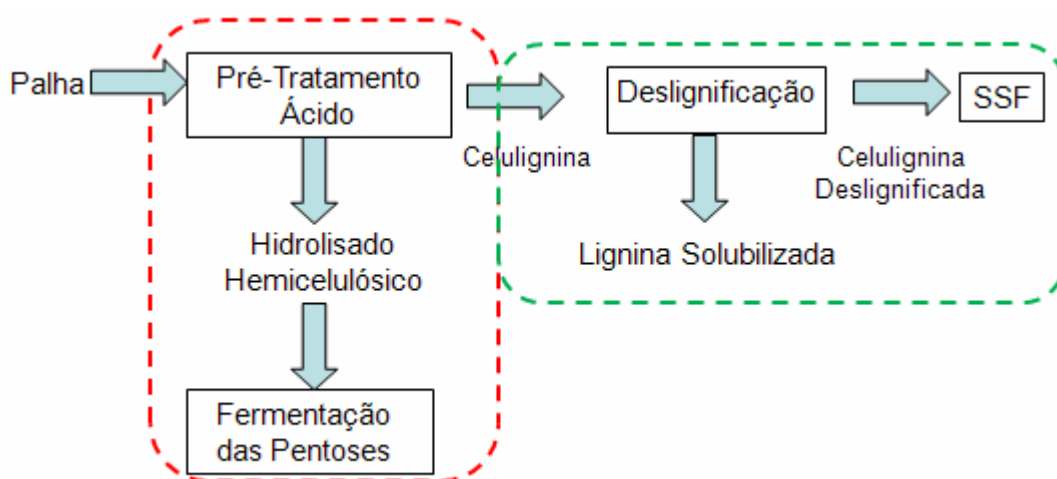


Figura IV.1: Fluxograma de todo o processo

IV.1-FRACÇÃO HEMICELULÓSICA

IV.1.1-Obtenção do hidrolisado

A palha de cana-de-açúcar utilizada para o desenvolvimento desta pesquisa foi fornecida pela Usina Costa Pinto de Piracicaba (SP). Inicialmente, o material foi submetido a uma lavagem para retirada de impurezas e em seguida a secagem a 60° C,

em estufa, com o intuito de garantir uma estocagem sem perigo de contaminação por fungos.

Foram testadas diferentes condições de pré-tratamento, com o objetivo de utilizar uma baixa concentração de ácido, durante a extração da fração hemicelulósica da palha. Para isso, foram elaborados dois planejamentos experimentais (Calado & Montgomery, 2003). Consideraram-se como variáveis independentes: a relação sólido:líquido e a concentração da solução de ácido sulfúrico utilizado, nos níveis apresentados nas Tabelas IV.1 e IV.2. Já a estratégia utilizada para misturar a palha com a solução ácida durante a realização da hidrólise foi à mesma em todos os experimentos: impregnou-se a solução de ácido sulfúrico na palha seca por dispersão, utilizando um borrifador manual, visando uma maior homogeneidade na mistura sólido:líquido (Betancur, 2005).

Tabela IV.1: Condições utilizadas no 1º planejamento experimental.

Fatores	Limite Inferior	Ponto Central	Limite Superior
Conc. Do ácido (%v/v)	0,5	1,0	1,5
Rel. sólido:líquido	1:3	1:2,5	1:2

Tabela IV. 2: Condições utilizadas no 2º planejamento experimental.

Fatores	Limite Inferior	Ponto Central	Limite Superior
Conc. Do ácido (%v/v)	0,5	1,0	1,71
Rel. sólido:líquido	1:4,0	1:3,5	1:3,0

A variável de resposta foi à maior concentração de xilose, para cada um dos planejamentos. Os experimentos foram feitos em duplicata, em fracos cônicos de 500mL, contendo 30g de palha e a respectiva quantidade de solução ácida, aplicando um tratamento térmico de 121 °C (1atm), durante 45 minutos.

A obtenção dos hidrolisados foi realizada em um reator de aço inox, que permite acoplamento de uma prensa hidráulica, Figura IV.2, para que a fração líquida, contendo os açúcares constituintes da fração hemicelulósica, fosse separada da fase sólida (celulignina).



Figura IV.2: Reator acoplado em prensa hidráulica

Depois dessa separação, o hidrolisado teve seu pH regulado entre 6 e 6,5, pela adição de hidróxido de cálcio sob agitação constante (Figura IV.3). Após o ajuste do pH, a suspensão foi filtrada a vácuo, para retirar o precipitado formado, e estocada. Todos os hidrolisados tiveram suas concentrações de xilose quantificadas por HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência).



Figura IV.3: Sistema utilizado para ajuste do pH do hidrolisado ácido

IV.1.2-Teste de lavagem

A fim de se avaliar a quantidade de xilose retida na celulignina, o sólido resultante do pré-tratamento foi lavado 3 vezes consecutivas com água destilada a 50° C. A quantidade de água utilizada em cada lavagem foi de 5mL para cada grama de celulignina, obtendo-se desta forma uma relação de 1:5. A água de lavagem teve, ainda, seu pH ajustado com hidróxido de cálcio e depois foi quantificada a concentração de xilose por cromatografia.

IV.1.3-Microrganismo

Para todos os processos fermentativos da xilose, utilizou-se a linhagem floculante da levedura *Pichia stipitis* CBS 5774, proveniente do banco de linhagens holandês “Central Bureau voor Schimmelcultures-CBS”. Esta levedura foi previamente catalogada como o microrganismo mais adequado para a conversão de D-xilose a etanol (Pereira Jr., 1991). Na Figura IV.4 é apresentada uma microfotografia das células mencionadas.

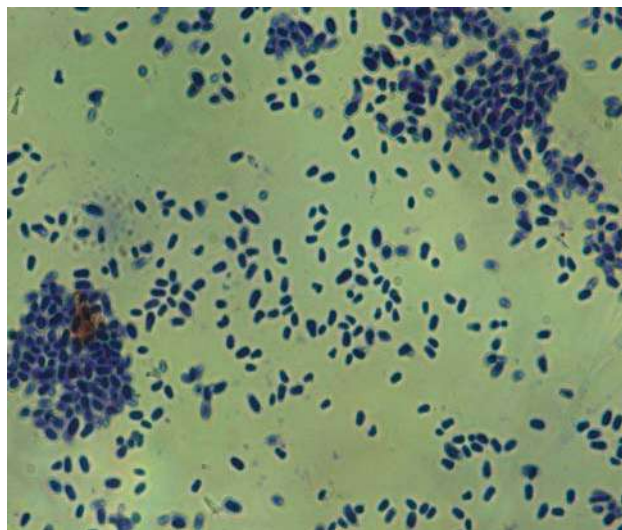


Figura IV.4: Levedura *Pichia stipitis* CBS 5774

IV.1.4-Manutenção do microrganismo

A cultura estoque de *P. stipitis* foi conservada em meio sólido, cuja composição está descrita na Tabela IV.3, deixando-se incubar durante três dias com a temperatura controlada a 30° C, para então, ser estocada a 5° C (Pereira Jr.,1991). Com o objetivo de manter as células ativas, repiques a partir do cultivo original foram realizados em câmara asséptica.

Tabela IV.3: Composição do meio de manutenção

Componente	Concentração (g/L)
D-xilose	5,0
Peptona	5,0
Extrato de Levedura	2,0
Agar-ágar	30,0

Fonte: Pereira Jr., 1991

IV.1.5-Meios empregados para a ativação, propagação e fermentação

IV.1.5.1-Meio de ativação

O meio utilizado para a ativação das células, mostrado na tabela IV.4, foi o mesmo empregado por Pereira Jr. (1991).

Tabela IV.4: Composição do meio utilizado para a ativação de células

Componente	Concentração
D-xilose	20,0 g/L
Extrato de levedura	2,0 g/L
Uréia	1,25 g/L
KH ₂ PO ₄	1,1 g/L
Solução de sais minerais e ácido cítrico	40,0 mL/L

Fonte: Pereira Jr., 1991

A solução de ácido cítrico e sais minerais é uma solução concentrada de oligoelementos, que serve para suplementar tanto o meio de ativação quanto os de propagação e fermentação. Sua composição pode ser observada na tabela IV.5.

A solução contendo a xilose como fonte de carbono foi preparada separadamente e esterilizada por 20 minutos a 0,5 atm, de modo que representou 25% do volume total. Em todas as soluções, o pH foi ajustado próximo de 6,0 utilizando de NaOH ou HCL (2 mol/L), conforme fosse necessário.

Tabela IV.5: Composição da solução de sais minerais e ácido cítrico

Componente	Concentração (g/L)
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,25
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,25
C ₆ H ₈ O ₇	12,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,9
MnSO ₄	0,19
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,30
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Al ₂ (SO ₄) ₃	0,0125
KI	0,009
H ₃ BO ₃	0,035
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,05

Fonte: Pereira Jr., 1991

IV.1.5.2-Meios de propagação celular

O processo de propagação foi realizado, utilizando-se duas etapas, com proporções diferentes de hidrolisado.

O meio de nutrientes para a 1^o aclimação (Figura IV.5) foi feito com a solução de xilose sendo substituída pelo hidrolisado numa proporção de 25% do volume total e manteve-se a mesma proporção de oligoelementos e nutrientes descritos anteriormente. Este valor foi determinado baseando-se em um teste de inibição da levedura *Pichia stipitis*, (Vásquez et al, 2006), uma vez que, esta, poderia inibir-se dependendo da concentração de substâncias tóxicas provenientes do tratamento ácido. A etapa seguinte foi realizada utilizando-se o hidrolisado em uma proporção de 50% do volume total.



Figura IV.5: Primeira aclimação da levedura *Pichia stipitis*.

IV.1.5.3-Metodologia para a propagação celular

Primeiramente, ativaram-se as células em meio sintético, seguindo a metodologia: do meio de manutenção da levedura, foi retirada uma alçada de células, para um frasco de 500 mL contendo 200 mL de meio de ativação, e este, foi então incubado a 30° C em um shaker a 250 rpm pelo período de 24 horas, tempo necessário para as células alcançarem uma concentração adequada.

A propagação celular ocorreu em duas etapas: a primeira utilizando meio contendo 25% de hidrolisado e a segunda 50% de hidrolisado. Na Figura IV.6 pode ser observado um esquema representativo.

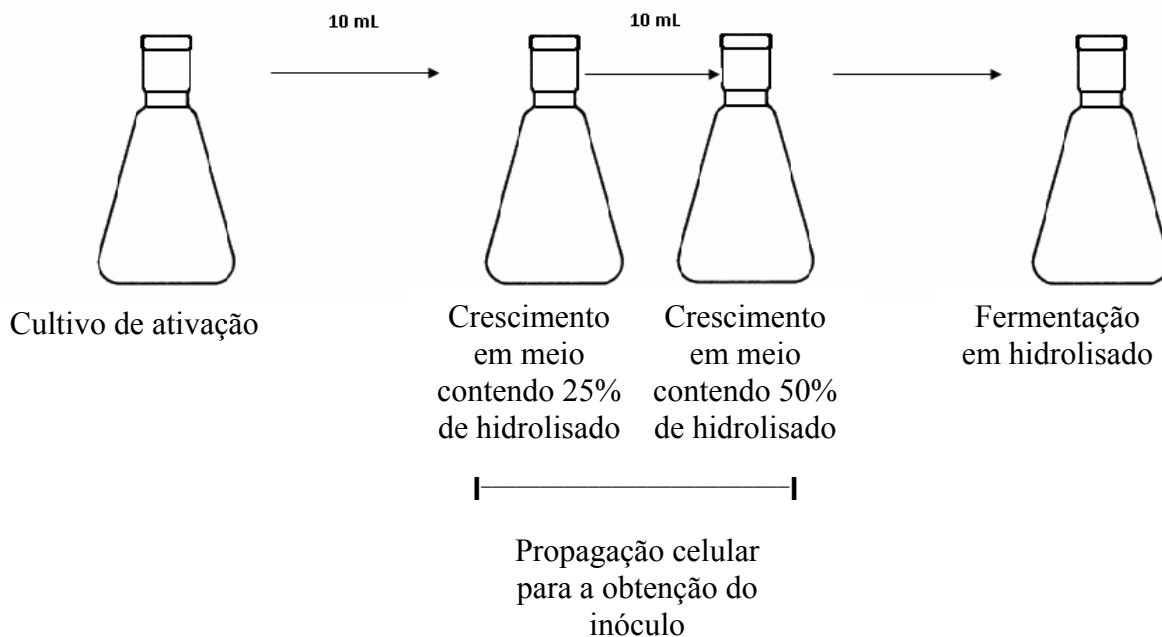


Figura IV.6: Esquema representativo da propagação celular

Para realizar este tipo de aclimatação, uma alíquota de 10 mL foi retirada do cultivo de ativação e utilizada como inóculo em um frasco já contendo 200 mL de meio no qual, 25% era de hidrolisado, e as mesmas proporções de sais e fontes de nitrogênio. Após 24 horas de incubação (Figura IV.7), nas mesmas condições já citadas, alíquotas de 10 mL foram retiradas do meio e utilizadas, novamente, como inóculo para frascos contendo 200 mL de meio cada, este era constituído de sais minerais, fontes de nitrogênio e 50% de hidrolisado. Estes foram incubados nas condições anteriormente citadas, porém por um período de 48 horas. Os cultivos assim obtidos foram reunidos e o volume apropriado de meio para obter a concentração de inóculo desejada foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. As células foram, posteriormente, ressuspendidas assepticamente.



Figura IV.7: Incubação da primeira aclimatação

IV.1.5.4-Meios de fermentação

Para o processo de fermentação o hidrolisado foi suplementado nas proporções de fontes de nitrogênio e oligoelementos já descritas na Tabela IV.4. Misturaram-se as fontes de fosfato e de nitrogênio já esterilizadas, ao volume de solução de sais a ser adicionado, sendo este esterilizado por filtração em membrana de porosidade de 0,45 μm .

IV.1.6-Fermentação em biorreator

A fermentação foi realizada em um bioreator Biostat B (B. Braun International), Figura IV.8, utilizando-se um vaso reacional de 2L, contendo 500 mL de meio de fermentação.



Figura IV.8: Fermentação em biorreator

O processo foi controlado automaticamente a uma agitação de 500 rpm, uma temperatura de 30° C, pH 6,0 através da adição de NaOH (2 mol/L) ou HCl (2 mol/L) e uma relação de aeração de 0,02 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto), utilizando-se uma concentração celular inicial próxima aos 10 g/L (Brito, 2000).

IV.1.7-Amostragem

Durante a fermentação foram retiradas alíquotas de 2 mL com o auxílio de pipetas estéreis. As amostras eram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm, sendo o sobrenadante destinado a dosagens de açúcares e produtos e o sedimentado a quantificação de células. Em todos os procedimentos de amostragem teve-se o máximo de rigor asséptico. Na Figura IV.9, encontra-se a metodologia utilizada para o processamento das amostras.

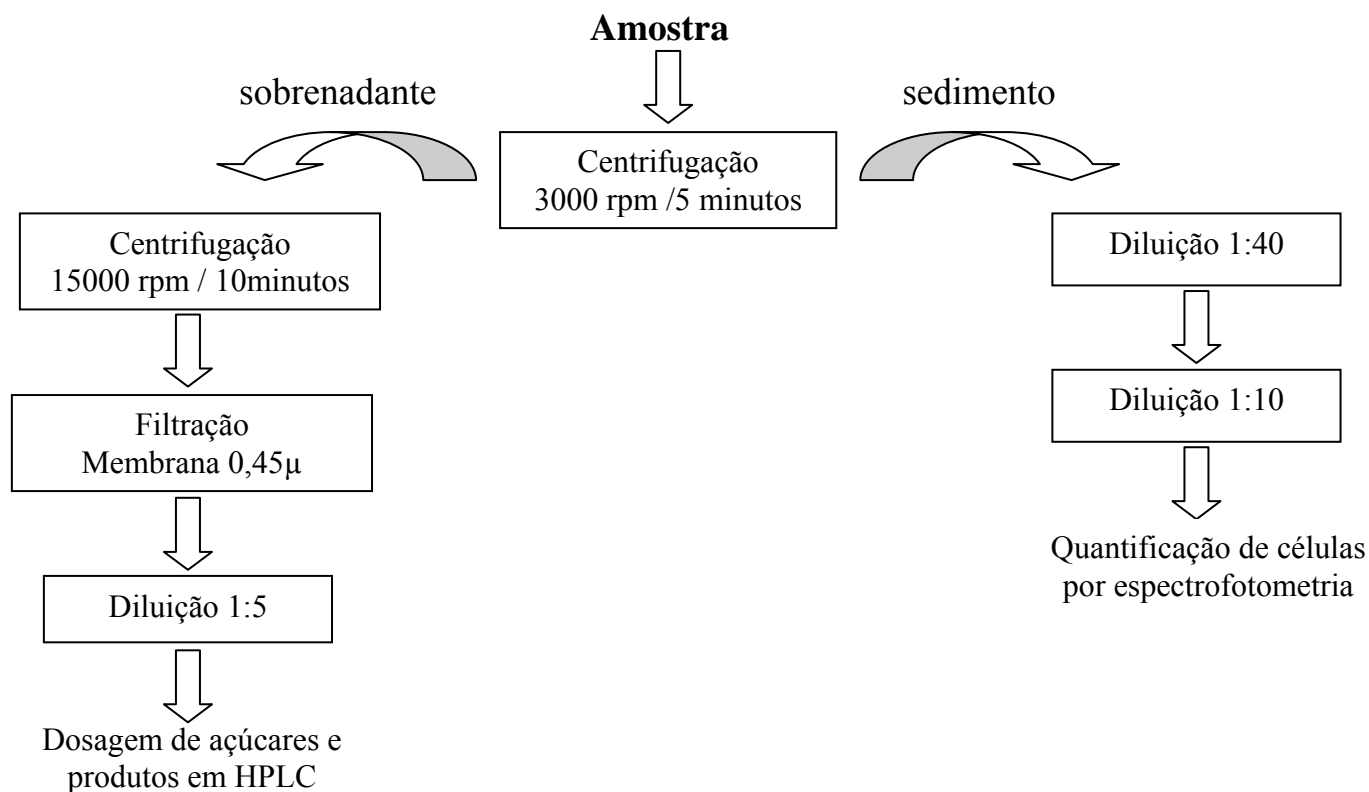


Figura IV.9: Organograma da metodologia de processamento das amostras.

IV.1.8-Métodos analíticos

IV.1.8.1-Determinação da concentração celular

A quantificação celular foi realizada por correlação da massa seca e absorvância a 570 nm (Leal, 1998). Assim, construiu-se uma curva padrão que relacionava o peso, em massa seca das células, com a absorvância (Figura IV.10). As células utilizadas na construção da curva padrão foram cultivadas em frascos contendo 200 mL de meio de ativação, incubadas por 48 horas, a 30° C em shaker a 250 rpm. As células foram então, colhidas, lavadas e resuspensas em água destilada, de modo a obter uma suspensão concentrada. A determinação da concentração foi realizada filtrando-se 20 mL da suspensão, procedimento este, desenvolvido em triplicata, realizando pesagem dos filtros até a obtenção do peso constante das amostras durante secagem a 80° C.

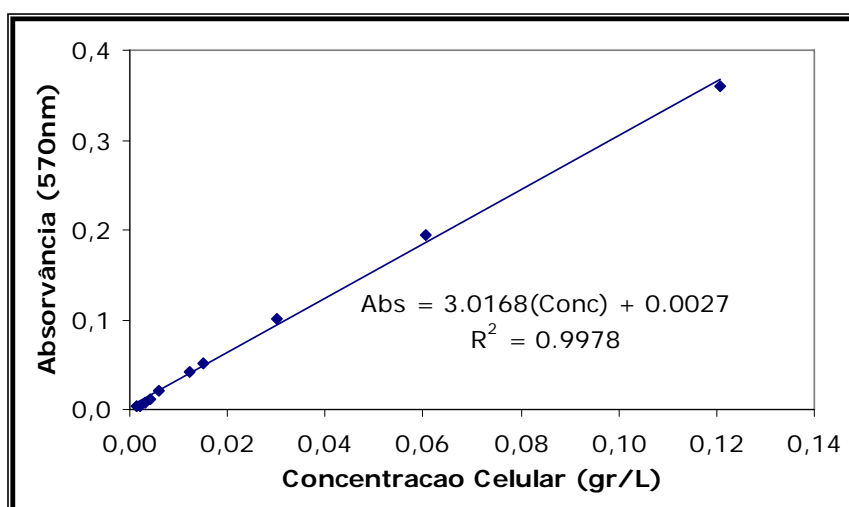


Figura IV.10: Curva de calibração para quantificação de massa celular

IV.1.8.2-Determinações quantitativas

As concentrações de xilose, etanol e xilitol, foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo Waters, acoplado a

uma coluna de troca catiônica Shodex Singer SC 1011. As condições operacionais utilizadas para as análises encontram-se especificadas na tabela IV. 6.

Tabela IV.6: Condições operacionais para análise cromatográfica de açúcares e etanol

Fase móvel	Água MilliQ degaseificada
Vazão da fase móvel	0,6 mL/min
Pressão máxima	1500 psi
Volume da amostra	20 µl
Temperatura externa	80° C (forno)
Temperatura interna	40° C (detector)

As concentrações analisadas nas amostras foram calculadas por comparação com padrões externos de concentração conhecida, com áreas cromatográficas calculadas pelo próprio equipamento. A equação utilizada para o cálculo das concentrações das amostras foi:

$$\text{Concentração da amostra} = \frac{\text{Área da amostra} \cdot \text{concentração do padrão}}{\text{Área do padrão}} \cdot \text{diluição}$$

IV.1.9-Variáveis de resposta:

Os parâmetros próprios de processos de fermentação foram considerados da seguinte forma:

- a) Fator de rendimento de produção de etanol (g/g)

$$Y_{PIS} = - (\Delta P / \Delta S) = (P - P_0) / (S_0 - S)$$

Onde:

P: concentração final de etanol (g/L)

P₀: concentração inicial de etanol (g/L)

S: concentração final de substrato (g/L)

S₀: concentração inicial de substrato (g/L)

b) Fator de rendimento para crescimento celular (g/g)

$$Y_{XIS} = - (\Delta X / \Delta S) = (X - X_0) / (S_0 - S)$$

Onde:

X: concentração final de células (g/L)

X₀: concentração inicial de células (g/L)

S: concentração final de substrato (g/L)

S₀: concentração inicial de substrato (g/L)

c) Produtividade volumétrica (g/L.h)

$$Q_p = (P - P_0) / t_f$$

Onde:

P: concentração final de etanol (g/L)

P₀: concentração inicial de etanol (g/L)

t_f: tempo de fermentação (h)

IV.2- FRAÇÃO CELULÓSICA

IV.2.1- Obtenção da matéria-prima

A matéria-prima utilizada nos processos de deslignificação que serão apresentados posteriormente foi a celulignina que é o subproduto do pré-tratamento com H₂SO₄. A Figura IV.11 ilustra a palha de cana-de-açúcar após sofrer o processo de pré-tratamento ácido.



Figura IV.11: Palha de cana-de-açúcar logo após sofrer o pré-tratamento ácido.

IV.2.2- Processos de deslignificação

Neste trabalho foram utilizadas diferentes técnicas de deslignificação. Testou-se a aplicação de NaOH como agente deslignificante nas condições propostas por Vásquez (2007) para bagaço de cana-de-açúcar. Adicionalmente, foram realizados experimentos utilizando processos de deslignificação denominados *organosolv*, já que um dos maiores custos para a produção de etanol a partir de celulose é a utilização do NaOH como agente deslignificante (Schlittler, 2006). Os solventes orgânicos foram utilizados em misturas descritas a seguir: acetona/água (50/50 %; v/v) (Araque et.al, 2007) , etanol/água (60/40 %; v/v) e ácido fórmico/ácido acético/água (20/60/20 %; v/v/v) (Xu et al, 2005)

A Figura IV.12 ilustra o sistema reacional utilizado no processo de deslignificação usando solventes orgânicos.



Figura IV.12: Sistema reacional utilizado no processo organosolv

As condições em que foram conduzidos os experimentos de deslignificação e os respectivos solventes utilizados, estão descritos na Tabela IV.6.

Tabela IV.6: Tipos de deslignificação e condições.

Agente Deslignificante	Catalisador	Relação S:L (g:mL)	Tempo de Reação	Condução do processo
Acetona/ Água	H ₂ SO ₄ 0,9%	1:7	2 h	Refluxo
Etanol/ Água	HCl 0,1%	1:20	4 h	Refluxo
Ácido Fórmico/ Ácido Acético/ água	HCl 0,1%	1:20	4 h	Refluxo
Hidróxido de Sódio 4%		1:20	½ h	1atm - 121°C

Depois de realizar o processo de *organosolv*, utilizando os solventes orgânicos, os sólidos provenientes desse tratamento foram lavados com água destilada e seus pHs foram ajustados com NaOH. Quando utilizamos NaOH 4% como agente deslignificante ajustou-se o pH com HCl. Em ambos os casos o pH foi ajustado para 6. Os sólidos foram secos em estufa e armazenados para serem utilizados em experimentos posteriores.

IV.2.3- Pré- hidrólise enzimática

As pré-hidrólises enzimáticas para a avaliação das deslignificações, foram realizadas em duplicata, a uma temperatura de 47^oC, meio tamponado com tampão citrato de sódio 50 mM (pH 5,0), uma carga enzimática de 26 FPU/g de celulignina tratada empregando uma relação sólido:líquido de 1:8 (Vásquez 2007). A variável escolhida como resposta do processo de hidrólise enzimática foi a concentração de glicose. Para que esta concentração fosse determinada foram retiradas amostras de cada experimento após 12 horas a partir do início da hidrólise.

IV.2.4- Preparado enzimático

O preparado comercial de celulasas utilizado na hidrólise enzimática foi Multifect CX 10 L(Genencor S.A). A atividade enzimática por mL de preparo foi 140 FPU (*Filter Paper Units*). Esta atividade foi determinada segundo o método da IUPAC com pequenas modificações (Ghose, 1987). Uma unidade de atividade FPÁsica é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um µmol de açúcares redutores por minuto por mL a uma temperatura de 50^oC, utilizando como substrato papel de filtro (Watman N^o 1).

IV.2.5- Microrganismo

Os experimentos de fermentação alcoólica foram realizados utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann) empregada no processo de panificação. A Figura IV.13 ilustra a foto em microscopia eletrônica da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

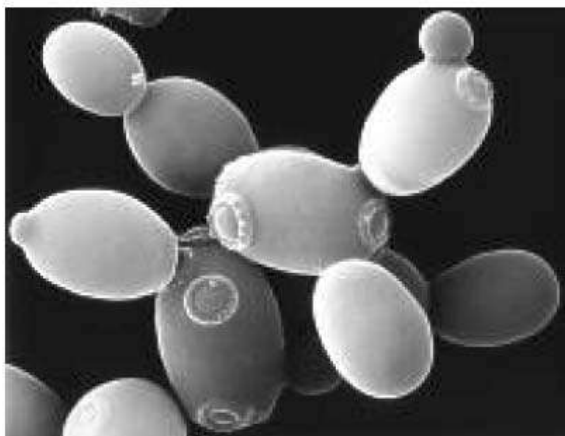


Figura IV.13: Foto em microscopia eletrônica da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte : Wheals, 2009

IV.2.6- Processo SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*).

SSF em fermentômetros: Os sólidos provenientes do tratamento com NaOH 4% e os sólidos provenientes do tratamento com solventes orgânicos sofreram o processo de fermentação e sacarificação simultâneas em fermentômetros de 250 mL com um volume de trabalho que variou, dependendo da quantidade de sólido utilizado, mantendo-se a relação sólido:líquido estipulada para cada ensaio, como indicado para cada experimento no capítulo de resultados. Para o processo foi utilizado tampão citrato de sódio (pH 5,0) como fase líquida, uma carga enzimática de 26 FPU/g, a concentração inicial de células de 2 g/L, 150 rpm. No caso da temperatura, a pré-hidrólise enzimática foi conduzida a 47°C (12 h) e, posteriormente, a temperatura do processo SSF foi 37°C, temperatura máxima que permite o desenvolvimento da levedura (Vásquez, 2007). A Figura IV.14 mostra o fermentômetro utilizado no processo SSF.

Para obter os perfis cinéticos e a concentração de etanol equivalente para o processo SSF foram utilizados fermentômetros, que são dispositivos que permitem a saída de CO₂, mas impedem a entrada de ar no sistema, possibilitando o acompanhamento da perda de massa. Posteriormente, assumindo uma conversão estequiométrica, foi calculada a concentração do etanol equivalente no meio.



Figura IV.14: Fermentômetro utilizado no processo SSF

IV.2.7- Caracterização da palha

Para determinar o percentual de celulose, hemicelulose, lignina e cinza da palha de cana-de-açúcar tanto “*in natura*” quanto após a realização do processo de deslignificação utilizando o melhor agente deslignificante, foi utilizado o método Klason (Sluiter et. al, Ververis et. Al) no qual os cálculos realizados encontram-se a seguir:

$$\text{Celulose (\% m / m)} = (0,9/0,96) \cdot C1 \cdot (v/m) \cdot \alpha \cdot 100$$

Onde:

0,90 = Coeficiente que resulta da relação entre peso molecular do polímero e do monômero de glicose;

0,96 = Rendimento de sacarificação

C1 = Concentração de glicose (g/L)

v = Volume total da solução de açúcar (L)

m = peso da amostra seca (g)

α = diluição da amostra (se houver)

$$\text{Hemicelulose (\% m / m)} = (0,88 / 0,93) \cdot (C1 - C2) \cdot (v/m) \cdot \alpha \cdot 100$$

Onde:

0,88 = Coeficiente que resulta da relação entre peso molecular do polímero e do monômero de glicose

0,93 = Rendimento de sacarificação

C1 = Concentração de glicose (g/L)

C2 = Concentração de açúcares redutores (g/L)

v = Volume total da solução de açúcar (L)

m = peso da amostra seca (g)

∞ = diluição da amostra (se houver)

$$\text{Lignina (\% m/m)} = \frac{W1 - W2}{m} \cdot 100$$

Onde:

W1 = Resíduo seco da filtração (g)

W2 = Peso do resíduo após calcinação (g)

m = peso da amostra seca (g)

$$\text{Cinza (\% m/m)} = \frac{W2}{m} \cdot 100$$

Onde:

W2 = Peso do resíduo após calcinação

m = peso da amostra seca (g)

Para a determinação da Lignina Ácido Solúvel (ASL) foi utilizado o protocolo de Determinação de Carboidratos Estruturais e Lignina em Biomassa da NREL (National Renewable Energy Laboratory):

$$\% \text{ ASL} = UV_{\text{abs}} \cdot \text{Volume de Filtrado} \cdot \text{Diluição} \cdot 100 / \varepsilon \cdot ODW_{\text{sample}}$$

Onde:

ε = Absorptividade, cujo valor é 30 L /g.cm

ODW_{sample} = massa seca da amostra

Para a determinação do teor de celulose, hemicelulose, lignina e lignina solúvel foram realizados experimentos em duplicata.

IV.2.8- Otimização da relação sólido-líquido sobre a palha de cana-de-açúcar deslignificada no processo SSF

Para determinar a melhor relação sólido:líquido na realização do processo SSF, foi utilizada celulignina deslignificada com o processo que sinalizou a melhor digestibilidade do sólido. Para esta etapa foram testadas as seguintes relações sólido:líquido: 1:4, 1:5; 1:6; 1:7; 1:8 (g:ml). Ao final do processo SSF a variável de resposta analisada foi a concentração de etanol.

IV.2.9- Validação das melhores condições para o processo SSF em biorreator

O SSF foi realizado em um bioreator BIOSTAT B (B. Braun International) com um volume nominal de 1,5 litros e um volume útil de 600 mL, dotado de controle de temperatura, controle de pH (eletrodo interno de referência de prata/cloreto de prata com precisão de 0,1 °C, METLER TOLEDO) e controle de espuma (sensor de condutividade com terminação metálica), todos conectados a uma interface para o controle proporcional-integral-derivativo (PID); sistema de agitação mecânica que consta de duas turbinas de 3,5 cm de diâmetro, com seis pás em cada uma e três chicanas no vaso reacional.

As condições utilizadas para o processo SSF em biorreator foram as seguintes: a melhor relação sólido:líquido, a fase líquida utilizada foi tampão citrato de sódio pH 5 50 mM, a carga enzimática foi de 26 FPU/g, o tempo de pré-hidrólise enzimática foi de 12 horas, a concentração inicial de células foi de 2g/L e a agitação utilizada foi de 150 rpm. A duração do processo SSF foi de 48 horas. A Figura IV.15 mostra o bioreator BIOSTAT B (B. Braun International) durante a condução do processo SSF.



Figura IV.15: Biorreator BIOSTAT B (B. Braun International) durante o processo SSF

IV.2.10- Amostragem

Ao final da etapa de pré-hidrólise enzimática foram retiradas alíquotas de 2 mL com o auxílio de pipetas automáticas com ponteiros estéreis. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 10000 rpm, sendo o sobrenadante destinado a dosagem de glicose. Depois desta etapa foi iniciado o processo SSF e ao final do mesmo foram retiradas alíquotas de 4 ml. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 10000 rpm, sendo o sobrenadante destinado a dosagem de etanol. Nas Figuras IV.16 e IV.17 encontram-se as metodologias utilizadas para o processamento das amostras.

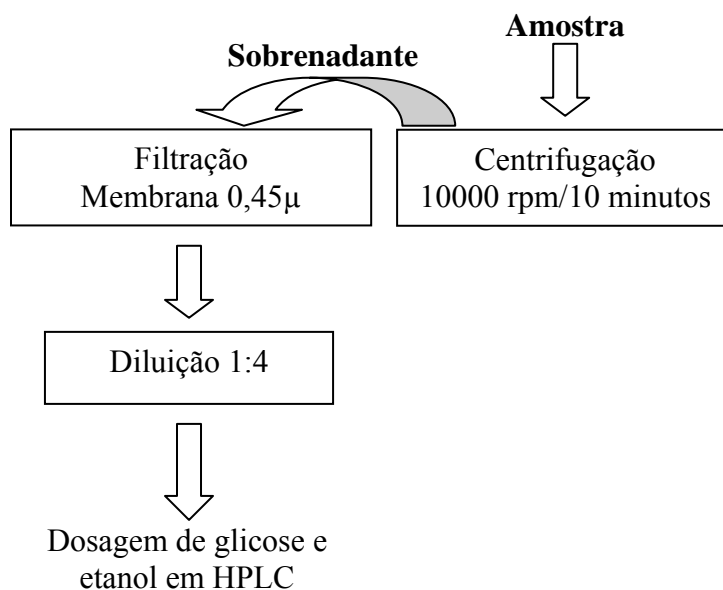


Figura IV.16 : Organograma da metodologia de processamento das amostras para dosagem de glicose e etanol em HPLC.

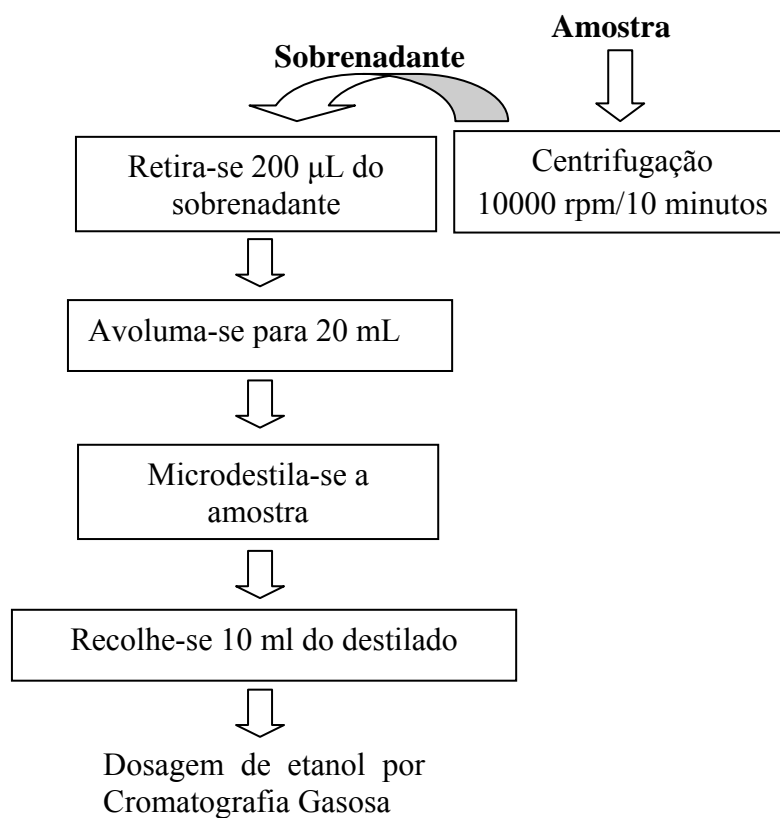


Figura IV.17: Organograma da metodologia de processamento das amostras para dosagem de etanol em cromatógrafo gasoso.

IV.2.11- Métodos analíticos

IV.2.11.1- Determinações quantitativas de glicose e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência

As concentrações de glicose e etanol também foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo Waters, acoplado a uma coluna de troca catiônica Shodex Singer SC 1011. As condições operacionais utilizadas para as análises já foram especificadas anteriormente na Tabela IV.6. Vale ressaltar que a concentração de glicose também foi determinada através da utilização de kit enzimático (Laborlab).

IV.2.11.2- Determinações quantitativas de etanol por cromatografia gasosa

Para a determinação analítica da concentração final de etanol foi realizado o procedimento descrito na Figura IV.16 que foi apresentada anteriormente. A Tabela IV.8 especifica as condições operacionais utilizadas no Cromatógrafo GC HP Agilent 6890.

Tabela IV.8: Condições operacionais do cromatógrafo gasoso

Cromatógrafo GC HP Agilent 6890	Método aquecimento (^o C min.)	Temperatura do forno (^o C)	Permanência (min.)
Detector FID	-----	40	1
Temperatura 250 ^o C			
Temperatura Injetor 300 ^o C	10	140	3
Gás de arraste Hélio	35	245	5
Fluxo 57,6 ml/ min.			
Coluna DBWAX 30 m x 250 μm x 0,25 μm	Integração da Curva: software ChemStation 0903		

CAPÍTULO V- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo apresentam-se os resultados do desenvolvimento das pesquisas feitas e são discutidos e comparados com a literatura disponível.

V.1- FRACÇÃO HEMICELULÓSICA

V.1.1-Otimização do processo de pré- tratamento ácido

A melhoria das condições utilizadas durante o pré-tratamento ácido é uma possibilidade para se aumentar a concentração de substrato no meio de fermentação, com a finalidade de se obter uma maior concentração final de etanol. Para isso, foi realizado um planejamento central composto de fase centrada, que é apresentado na Tabela V.1.

A Tabela V.2 apresenta a análise da variância, ANOVA, gerada a partir dos resultados obtidos, utilizando-se o programa Design-Expert 6.0.6. Nesta análise pôde ser constatado que só a influência linear (L) e quadrática (Q) da relação sólido:líquido e a linear (L) da concentração de ácido apresentaram efeitos significativos dentro do intervalo avaliado para cada fator. Pode-se verificar também que além deste modelo ser significativo, ele representa um bom ajuste dos resultados experimentais, o que pode ser comprovado pela magnitude do coeficiente de correlação ($R^2=0,96$) e a não significância da falta de ajuste (*Lack of Fit*). Além da ANOVA, as magnitudes do efeito de cada variável independente, assim como das suas interações estão apresentadas na forma do diagrama de Pareto, (Figura V.1), estabelecendo-se desta forma, quais efeitos encontram-se dentro do grau de confiança de 95%. Logo, a variável mais importante dentro da faixa analisada foi a concentração de ácido.

Tabela V.1: Matriz Experimental e Resultados Utilizados para o Pré-Tratamento Ácido

Experimento	Conc. H ₂ SO ₄ (%v/v)	Relação S:L(g:mL)	Xilose (g/L)	Glicose (g/L)	Açúcares totais (g/L)
1	0,50 (-1)	1:2,0(+1)	46,99	3,73	50,73
2	1,00 (0)	1:2,0(+1)	32,73	0,73	33,46
3	1,50 (+1)	1:2,0(+1)	3,30	0,20	3,50
4	0,50(-1)	1:2,5(0)	40,71	5,49	46,20
5	1,50(+1)	1:2,5(0)	66,97	1,59	68,57
6	0,50(-1)	1:3,0(-1)	53,27	1,74	55,02
7	1,00(0)	1:3,0(-1)	23,13	0,56	23,69
8	1,5(+1)	1:3,0(-1)	52,24	1,59	53,84
9	1,0 (0)	1:2,5(0)	51,94	3,77	55,71
10	1,0 (0)	1:2,5(0)	56,05	0,58	56,63
11	1,0 (0)	1:2,5(0)	36,99	5,34	42,33
12	1,0 (0)	1:2,5(0)	58,07	1,68	59,75

(0) Valores para nível central

Tabela V.2: ANOVA com concentração de xilose como variável de resposta, R²=0,96

Fator	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F	Prob.	
(1)Ácido(L)	1635,81	1	1635,81	167,64	0,0059	Significativo
Ácido(Q)	117,59	1	117,59	12,05	0,0739	Não significativo
(2)S:L (L)	347,02	1	347,02	35,56	0,0269	Significativo
S:L (Q)	789,45	1	789,45	80,90	0,0121	Significativo
1(L) e 2(L)	53,07	1	53,07	5,44	0,1449	Não significativo
Falta de ajuste	119,69	3	39,89	4,09	0,2028	Não significativo
Erro Puro	19,52	2	9,76			
Total	3326,47	10				

S:L: relação sólido:líquido; Ácido: concentração de ácido sulfúrico; L: efeito linear; Q: efeito quadrático.

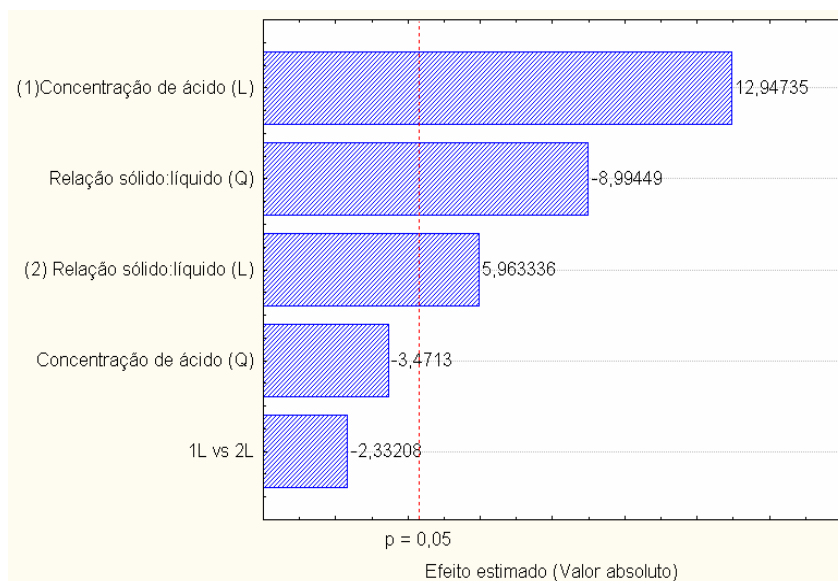


Figura V.1: Diagrama de Pareto para determinação do efeito dos fatores do pré-tratamento ácido de palha de cana-de-açúcar sob a concentração de xilose.

Cabe ressaltar que o diagrama de Pareto vai ao encontro da análise da variância já feita, uma vez que a influência linear (L) e quadrática (Q) da relação sólido:líquido e a linear da concentração de ácido estão dentro do grau de confiança de 95% .

Os resultados apresentados na Tabela V.1 foram tratados nos softwares (Statistic 6.0), que permitiu determinar as condições de pré-tratamento para alcançar a concentração máxima de xilose, que está representada na Tabela V.3, tendo como critérios de otimização, uma baixa concentração de ácido e de relação sólido:líquido. Desta forma, objetiva-se diminuir custos de insumos e geração de resíduos, e mantendo-se uma menor relação sólido:líquido facilitando a parte técnica do processo.

Tabela V.3: Valores preditos para maximização da concentração de xilose durante o pré-tratamento ácido de palha de cana-de-açúcar.

Concentração de ácido (%v/v)	Relação sólido:líquido (g:mL)	Concentração de xilose (g/L)
0,95	1:3	47,00

Durante a análise estatística dos resultados, apenas foi considerada a concentração de xilose uma vez que a concentração de glicose foi marcadamente menor, como pode ser observado na Tabela V.1, tornando igualmente irrelevante considerar os açúcares totais como variáveis de resposta.

Fez-se um novo planejamento experimental central composto rotacional, (Tabela V.4), utilizando-se a mesma metodologia anterior que visava à obtenção de um hidrolisado com uma alta concentração de xilose, só que desta vez com uma concentração de solução de ácido um pouco maior que a anterior, o que torna as condições de processo um pouco mais severas, já que esta variável se mostrou a mais importante do pré-tratamento e qualquer modificação em seu valor causa um grande impacto no processo como um todo.

Tabela V.4: Planejamento para o pré-tratamento ácido de palha de cana-de-açúcar em condições mais severas.

Experimento	Conc. H ₂ SO ₄ (%v/v)	Relação S:L (g/mL)	Xilose (g/L)	Glicose (g/L)	Açúcares Totais (g/L)
1	0,50(-1)	1:3,00 (+1)	9,22	1,06	10,28
2	1,50(+1)	1:3,00 (+1)	65,53	6,38	71,92
3	0,50(-1)	1:4,00 (-1)	18,65	0,86	19,52
4	1,50(+1)	1:4,00 (-1)	51,75	3,86	55,61
5	0,29(-α)	1:3,50 (0)	0,35	0,50	0,85
6	1,71(+α)	1:3,50 (0)	53,78	4,75	58,53
7	1,00(0)	1:2,79 (+α)	37,83	1,92	39,76
8	1,00(0)	1:4,21 (-α)	48,33	3,72	52,06
9	1,00 (0)	1:3,50 (0)	46,36	3,19	49,56
10	1,00 (0)	1:3,50 (0)	50,40	3,51	53,92
11	1,00 (0)	1:3,50 (0)	50,71	3,35	54,07
12	1,00 (0)	1:3,50 (0)	52,40	3,490	55,89

(0) Valores para nível central

Neste segundo planejamento, a melhor condição de trabalho considerando-se a máxima concentração de xilose, como critério de otimização, é apresentada na Tabela V.5.

Tabela V.5: Valores preditos para maximização da concentração de xilose no 2º planejamento

Concentração de ácido (%v/v)	Relação sólido:líquido (g/mL)	Concentração de xilose (g/L)
1,5	1:3	53,00

Neste novo planejamento, as magnitudes do efeito de cada variável independente (linear e quadrático), assim como o efeito das suas interações sobre a concentração final de xilose, também são apresentadas na forma de diagrama de Pareto, (Figura V.2), estabelecendo, desta forma, quais destes efeitos encontram-se dentro do grau de confiança.

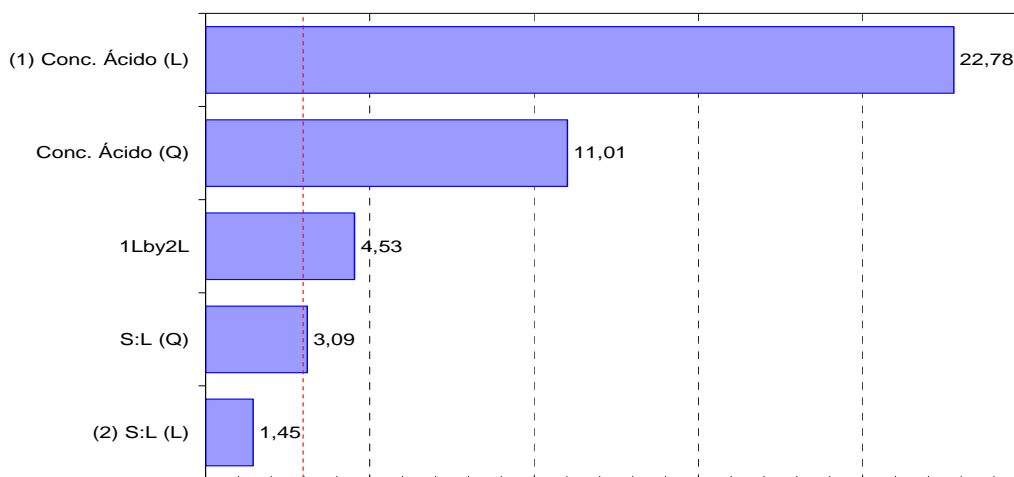


Figura V.2: Diagrama de Pareto do 2º planejamento para determinação do efeito dos fatores do pré-tratamento ácido de palha de cana-de-açúcar sob a concentração de xilose.

Cabe destacar que os fatores correspondentes ao efeito quadrático (Q) das duas variáveis mostraram significância estatística ($p\text{-level} < 0,05$), do mesmo modo que a interação linear (L) da concentração de ácido e a interação deste *versus* relação

sólido:líquido. Só o fator correspondente ao efeito linear da relação sólido:líquido, encontra-se fora do limite de confiança.

Com os resultados da análise estatística, pode-se verificar que na faixa analisada neste segundo planejamento, a variável com maior efeito sobre a concentração final de xilose, durante o pré-tratamento, é a concentração de ácido com um efeito linear positivo, de magnitude maior em mais de 10 vezes ao efeito linear correspondente da relação sólido:líquido. Os efeitos positivos indicam que níveis maiores das variáveis levariam à obtenção de concentração de xilose mais altas.

Analisando os resultados dos dois planejamentos e visando diminuir a severidade do processo, uma vez que o microrganismo poderia ser inibido por tóxicos gerados em condições mais severas, o que faria não ocorrer à fermentação, optou-se por utilizar as condições do pré-tratamento ácido dadas pelo primeiro planejamento. Isto se deve ao fato de que no segundo planejamento haveria um aumento em torno de 64 % na concentração de ácido para um incremento de apenas 5 g/L na concentração final de xilose, o que acarretaria um aumento no custo do processo como um todo, que seria necessário mais ácido sulfúrico para o pré-tratamento ácido e mais hidróxido de cálcio para regular o pH do hidrolisado.

Com o objetivo de verificar mais claramente o comportamento da concentração de xilose dentro das possíveis condições avaliadas para o processo, é apresentado o gráfico de superfície de resposta (Figura V.3) em torno das condições preditas pelo modelo.

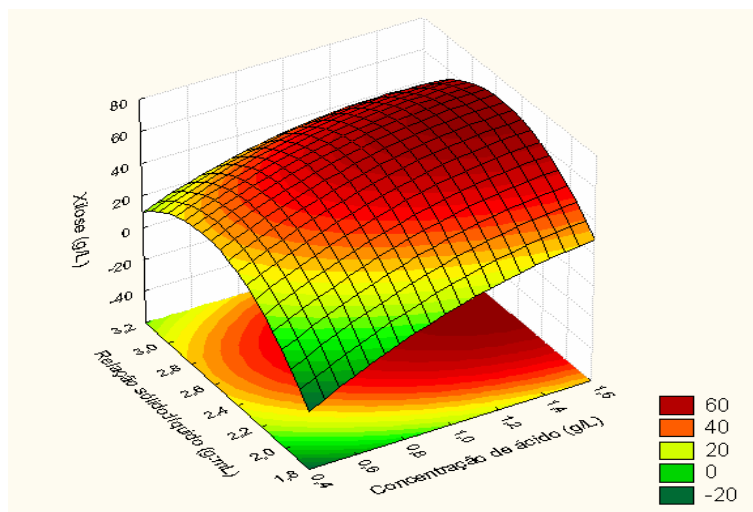


Figura V.3: Superfície de resposta para a concentração final de xilose após pré-tratamento ácido de palha de cana-de-açúcar.

Nesta figura pode-se observar uma maior curvatura da superfície quando se varia a concentração de ácido, variável considerada a mais significativa na faixa do planejamento. A superfície não apresentou um máximo absoluto, mas foi verificada uma estabilidade na área correspondente a região das condições mais altas das duas variáveis, obtendo-se assim, uma concentração de xilose de cerca de 48 g/L. Este resultado vai ao encontro do já discutido anteriormente.

V.1.2-Teste de lavagem da palha de cana-de-açúcar

Na Tabela V.6, verifica-se que a xilose ainda fica retida no sólido após o término do pré-tratamento ácido.

Tabela V.6: Quantidade de xilose da água de lavagem

Experimento	Relação S:L (g/mL)	Lavagem	Xilose (g/L)
1	1:2	1º	+1,03
1	1:2	2º	+0,11
1	1:2	3º	+0,00
2	1:3	1º	+1,06
2	1:3	2º	+0,14
2	1:3	3º	+0,00

Os testes foram realizados com a concentração de ácido considerada ideal para o pré-tratamento, e com duas diferentes relações sólido:líquido, a fim de verificar se esta teria alguma influência sobre a quantidade de xilose retida no sólido.

Pode-se observar que, independentemente da relação sólido:líquido utilizada, apenas uma quantidade irrelevante de xilose fica ainda retida no sólido após pré-tratamento ácido, mostrando-se assim a eficiência na separação de fases líquida (hidrolisado hemicelulósico) e sólida (celulignina ácida).

V.1.3-Fermentação com o hidrolisado obtido em condições ótimas

O hidrolisado obtido nas condições ótimas foi suplementado com uréia, extrato de levedura, e solução de sais, foi fermentado utilizando-se células aclimatadas em duas etapas. Na Figura V.4, está representado o perfil cinético deste processo.

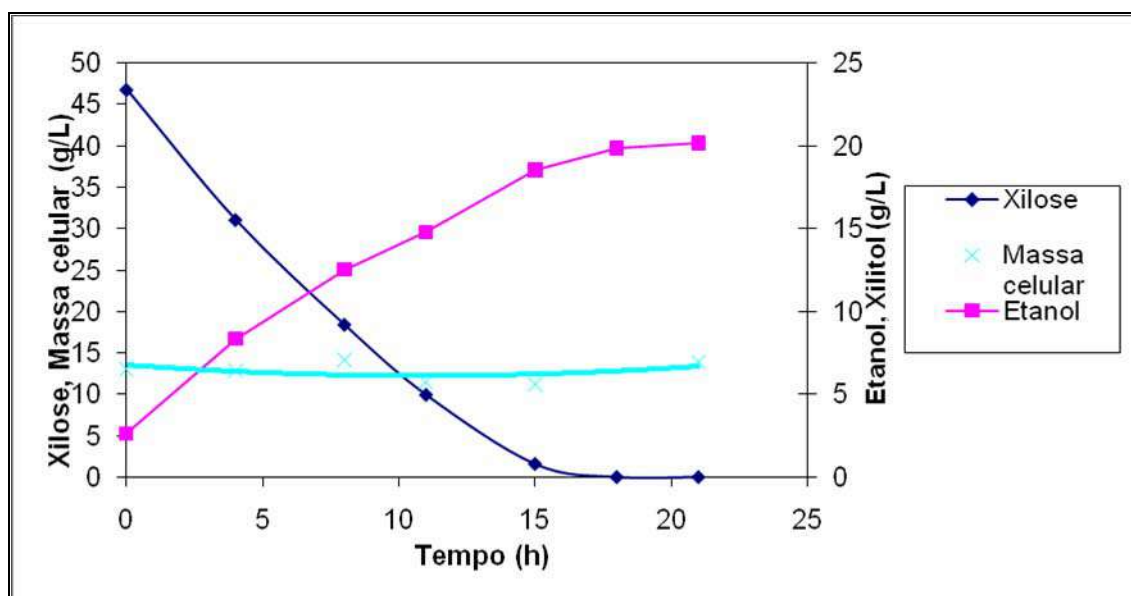


Figura V.4: Perfil cinético da fermentação das pentoses provenientes da fração hemicelulósica em Biorreator STR.

Como pode ser observada, a taxa de consumo de xilose foi constante até as 15 horas de processo, tendo um valor final global de 2,60 g/L.h com um tempo de processo de 18 horas. A concentração celular manteve-se quase constante, com um fator de rendimento ($Y_{x/s}$) de 0,02 g/g, indicando um direcionamento do metabolismo da levedura para a produção de etanol. Este fato pode decorrer da baixa disponibilidade do oxigênio no meio dadas às condições de aeração utilizadas.

A respeito da produção de etanol, o perfil de concentração do produto mostra que na primeira etapa da fermentação, até as 5 horas do processo, observou-se a maior taxa de produção (1,14 g/L.h), já na segunda etapa, mostrou-se relativamente constante até as 15 horas de fermentação (1,02 g/L.h), momento em que a concentração de etanol começou a se estabilizar.

O processo, após 18 horas, alcançou uma concentração final de 19,9 g/L de etanol com uma produtividade volumétrica (Q_p) e um rendimento ($Y_{p/s}$) de 1,1 g/L.h e 0,37 g/g, respectivamente, estando a xilose já totalmente consumida. A concentração celular manteve-se em uma concentração de 14,0 g/L, durante todo o processo.

A produção de etanol mostrou-se relevante uma vez que se obteve uma conversão de xilose em etanol de aproximadamente 43%, valor consistente com outros valores reportados na literatura como no trabalho realizado por Zhao (2010) (42%) utilizando a mesma matéria-prima e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada para o processo de fermentação, que durou 72 horas.

V.2- FRACÇÃO CELULÓSICA

V.2.1- Caracterização da palha de cana-de-açúcar utilizada no pré- tratamento ácido e no processo de fermentação e sacarificação simultâneas

A Tabela V.7 apresenta o teor de celulose, hemicelulose, lignina total e cinzas presentes tanto na palha de cana-de-açúcar *in natura* quanto na palha de cana-de-açúcar após sofrer o processo de deslignificação utilizando NaOH 4 % como agente deslignificante.

Tabela V. 7: Teor de celulose, hemicelulose, lignina total e cinzas presente na palha *in natura* e na palha deslignificada com NaOH 4%

Material Palha de cana-de- açúcar	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Lignina Ácido Solúvel (%)	Lignina Total* (%)	Cinzas (%)
<i>in natura</i>	22,46	20,17	17,92	0,28	18,2	10,17
deslignificada	63,84	11,28	9,5	0,43	9,93	0,44

* A Lignina Total é obtida a partir da soma da Lignina obtida pelo método Klason com a Lignina Ácido Solúvel obtida pelo Protocolo de Determinação de Carboidratos Estruturais e Lignina em Biomassa da NREL (National Renewable Energy Laboratory).

O teor de outros compostos na palha de cana-de-açúcar *in natura* é de 29 % e na palha de cana-de-açúcar deslignificada com NaOH foi de 14,51%.

Na literatura, a composição lignocelulósica da palha de cana-de-açúcar é reportada como 45,1% de celulose, 25,6% de hemicelulose, 12,7% de lignina, 8% de cinzas, 4,3% de outros materiais e 9,7% de umidade (Rossel, 2005). Comparando com o resultado obtido neste trabalho, a composição lignocelulósica da palha encontrada foi um pouco diferente. Porém, deve-se ressaltar que a proporção das frações varia segundo a origem do vegetal, época e local da colheita, espécie, entre outros fatores. Quanto à composição da palha deslignificada, os resultados indicaram que os pré-tratamentos aplicados ao material lignocelulósico foram bem sucedidos, pois mostraram uma

diminuição no teor de hemicelulose e lignina, enquanto aumentou-se consideravelmente o teor de celulose, devido à retirada de parte da lignina e da hemicelulose que possibilitou à acessibilidade a celulose.

V.2.2- Avaliação do processo SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*)

Um acompanhamento da perda de massa devido ao desprendimento de CO₂ foi realizado para cada experimento. Na Figura V.5 são apresentados os perfis cinéticos para os experimentos usando diferentes agentes deslignificantes e na Tabela V.8 são mostradas as concentrações de glicose e etanol obtidas nos experimentos.

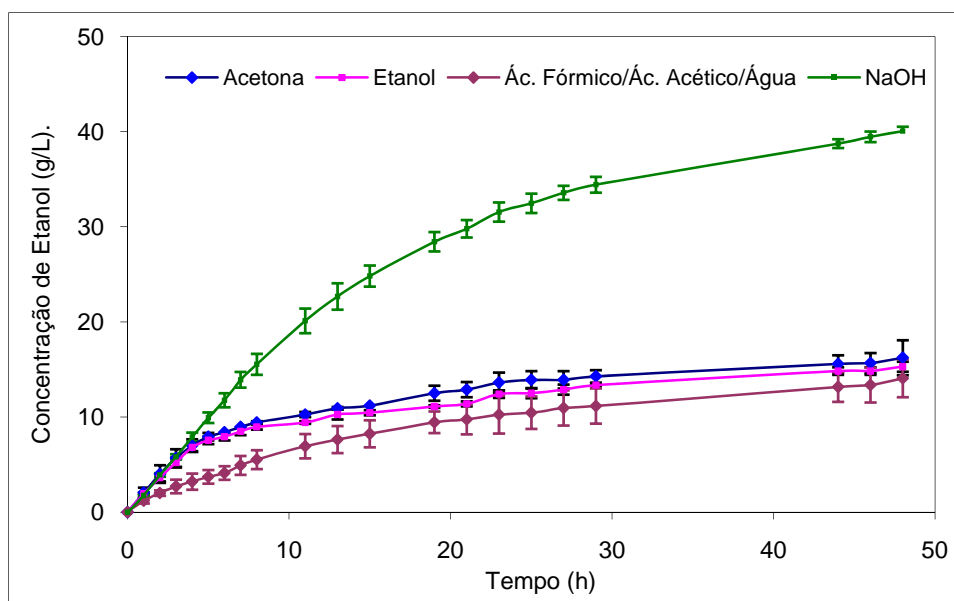


Figura V.5: Perfis cinéticos obtidos para o etanol equivalente dos experimentos utilizando sólidos proveniente de diferentes processos deslignificantes.

Tabela V.8: Resultados finais para pré-hidrólise e SSF de sólidos submetidos a diferentes tratamentos de deslignificação.

Agente Deslignificante	Concentração de Glicose (g/L)	Etanol Equivalente (g/L)	Etanol (g/L)
Acetona/ Água	18,73	16,24	11,40
Etanol/Água	21,77	15,31	11,70
Ácido Fórmico/Ácido Acético/ Água	17,36	14,07	8,35
NaOH 4%	48,14	40,05	34,00

Os resultados sinalizaram que o melhor agente deslignificante foi o NaOH 4%, já que dito processo permitiu atingir uma concentração de glicose, após a etapa de pré-hidrólise enzimática, de 48,14 g/L e uma concentração final de etanol de 34 g/L, enquanto quanto utilizados os sólido obtidos de processos *organosolv* ditas respostas mostraram-se marcadamente inferiores (Figura V.5, Tabela V.8). Provavelmente, a geração de uma celulose menos susceptível à pré-hidrólise enzimática se deve a uma possível inibição por solvente provavelmente devido a uma remoção parcial e não muito eficiente do solvente. Por essa razão quando estes sólidos foram utilizados como matéria-prima foi obtida uma baixa concentração de glicose ao final da etapa de pré-hidrólise enzimática o que ocasionou uma baixa concentração de etanol ao final do processo SSF. Vale ressaltar que, na literatura, os processos *organosolv* são utilizados nas etapas de branqueamento de polpas celulósicas para possibilitar a aplicação de condições mais brandas no processo utiliza reagentes não clorados (Raymond e Akhtar, 1998) e para um simples fracionamento da polpa em lignina e monossacarídeos (Pan e Sano, 2000).

Após a definição do melhor agente deslignificante, foi realizado um novo experimento para avaliar a melhor relação sólido:líquido a ser utilizada no processo SSF utilizando os sólidos provenientes desta deslignificação. A Figura V.6 apresenta os perfis cinéticos para o etanol equivalente dos experimentos utilizando diferentes relações S:L e a Tabela V.9 mostram as concentrações de glicose, após pré-hidrólise enzimática, e etanol, no final do processo SSF, obtidas nos experimentos.

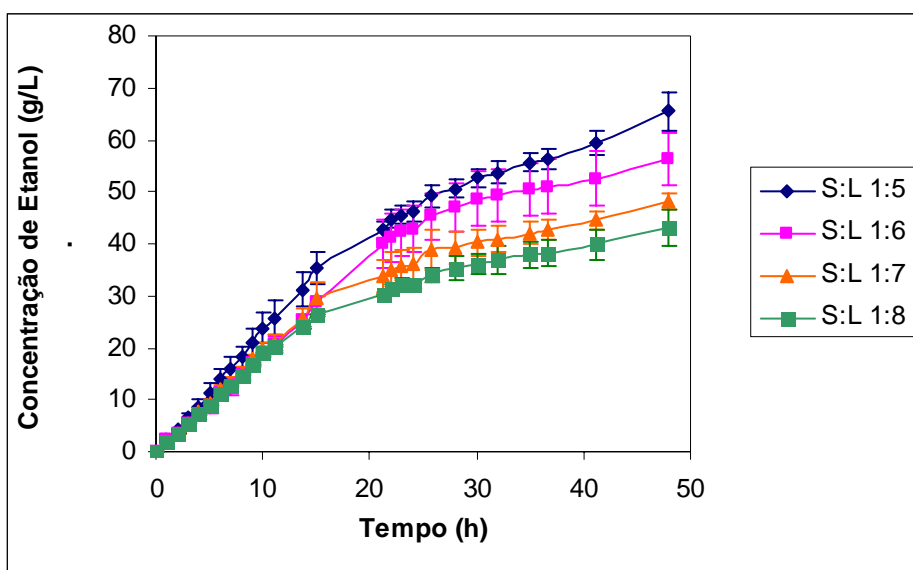


Figura V.6: Perfis cinéticos obtidos para o etanol equivalente dos experimentos em diferentes relações S:L com sólido pré-tratado com Não (agente deslignificante)

Tabela V.9: Resultado dos experimentos utilizando diferentes relações S:L utilizando NaOH como agente deslignificante

Relação Sólido:Líquido	Concentração de Glicose (g/L)	Etanol Equivalente (g/L)	Concentração de Etanol (g/L)
1:5	68,84	65,44	50,48
1:6	60,20	56,28	40,31
1:7	56,38	48,24	36,06
1:8	49,84	43,12	33,44

Os resultados do experimento sinalizaram que a melhor relação sólido:líquido foi de 1:5 (g:ml), pois apresentou uma concentração de glicose, após a etapa de pré-hidrólise enzimática, de 68,84 g/L e uma concentração final de etanol de 50,48 g/L. Adicionalmente, foi testada a relação sólido:líquido de 1:4, mas a mesma não possibilitou a hidrólise do sólido. Cabe ressaltar que quando utilizadas relações sólido:líquido maiores o sólido apresenta uma hidrólise incompleta, pois a quantidade de água livre foi muito baixa, o que dificulta a ação da enzima. Isto não necessariamente esta relacionado com uma redução da atividade enzimática, e sim com problemas de transferência de massa decorrentes de um sistema altamente impactado de sólidos. Todavia, utilizando-se outras estratégias de condução de processo, objetivando-se a busca de melhores resultados, pode ser que relações sólido:líquido maiores funcionem.

A figura V.7 apresenta o resultado do experimento conduzido em biorreator com as melhores condições encontradas para o processo SSF.

Ao final da etapa de pré-hidrólise enzimática a concentração de glicose foi de 66,13 g/L. Após 48 horas de processo SSF a concentração final de etanol foi de 51g/L com uma produtividade volumétrica (Q_p) de 1,06 g/L.h, um fator de rendimento em função do teor de celulose ($Y_{p/s}$) de 0,40 g/g e a eficiência de conversão da glicose em etanol foi de 70,6%.

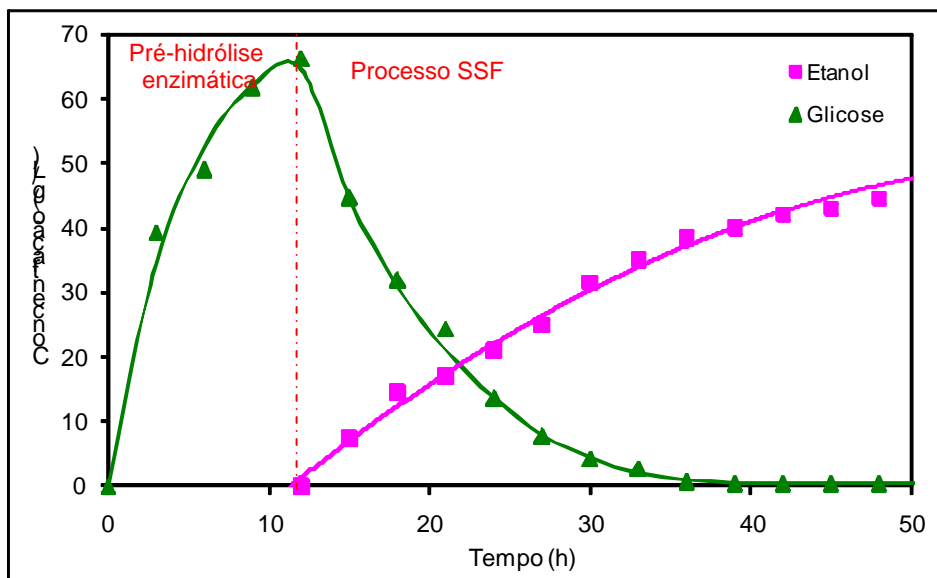


Figura V.7: Perfil cinético do processo SSF realizado em biorreator

CAPÍTULO VI: CONCLUSÕES

- A composição lignocelulósica obtida para a palha de cana-de-açúcar *in natura* foi de 22,46% de celulose, 20,17% de hemicelulose, 18,2% de lignina, 10,17% de cinzas;
- A concentração de ácido mostrou-se a variável mais importante no pré-tratamento ácido da palha de cana-de-açúcar, dentro da faixa analisada, sendo determinante na concentração final de xilose obtida no hidrolisado;
- As condições indicadas como as melhores para o pré-tratamento foram as seguintes: concentração de ácido de 0,95% (v/v), relação sólido:líquido de 1:3 (g de palha: mL de solução de ácido) para um tratamento térmico de 1 atm por 45 minutos. Nestas condições foi possível obter hidrolisado com conteúdo de xilose de 47,0 g/L;
- Quando fermentado, o hidrolisado obtido nas condições ótimas de pré-tratamento ácido alcançou uma concentração final de etanol de 19,9 g/L e a produtividade de volumétrica de 1,03 g/L.h;
- O processo de extração de xilose é eficiente uma vez que havia pouca xilose retida no sólido;
- Ficou demonstrado que é possível o desenvolvimento de eficientes processos de fermentação com hidrolisado hemicelulósico da palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração, pela ação da levedura da linhagem *Pichia stipitis* CBS 5774;
- Tanto o pré-tratamento alcalino quanto o pré-tratamento utilizando solventes orgânicos aumentaram a acessibilidade das enzimas do complexo celulolítico à celulose, melhorando o processo de pré- hidrólise enzimática. Sendo assim, todos os pré-tratamentos avaliados apresentaram efeitos positivos, com diferentes magnitudes;
- O pré-tratamento alcalino utilizando uma solução de NaOH 4% (m/v) como agente deslignificante, em uma relação sólido:líquido de 1:20, mantida a 121 °C, por 30 minutos foi o que proporcionou o maior aumento na acessibilidade da celulose ao ataque enzimático;

- A composição lignocelulósica da palha de cana-de-açúcar deslignificada com NaOH 4% foi de 63,84% de celulose, 11,28 % de hemicelulose, 9,93% de lignina e 0,44% de cinzas, este resultado sinalizou que os pré-tratamentos aplicados foram eficientes, pois houve uma redução no teor de lignina e hemicelulose, com um aumento no teor de celulose;
- Com base nos resultados obtidos neste trabalho foi possível produzir etanol de segunda geração a partir do processo SSF utilizando palha de cana-de-açúcar como matéria-prima desde que o processo de deslignificação seja a hidrólise alcalina utilizando como agente deslignificante o NaOH 4%%, a etapa de pré-hidrólise enzimática seja realizada utilizando uma relação sólido:líquido de 1:5 e o processo SSF seja conduzido segundo as condições descritas ao longo deste trabalho;
- A palha de cana-de-açúcar tem um bom potencial para a produção de etanol de segunda geração, uma vez que se pode aproveitar tanto sua fração hemicelulósica quanto a celulósica, se estas forem separadas e processadas de forma diferente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adsul, M.G; Ghule, J.E; Shaik, H.; Singh, R.; Bastawde, K. B.; Gokhale, D.V e Varma, A. J. (2005) Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, p. 6-10.

Akhatar, M., Blanchette, R. A, Myers, G. E Kirk, T. K. (1998) An overview of biomechanical pulping research, In: *Environmentally Friendly Technologies for Pulp and Paper Industry*. New York: John Wiley and sons, p. 309-383.

Araque E., C. Parra, J. Freer, D. Contreras, J. Rodríguez, R. Mendonça, J. Baeza (2007) Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology* (2007).

Awafo, V.A. (1997) Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics. Tese de Doutorado. Departamento de Ciência de Alimentos e Química Agrícola, McGill University, Canadá.

Badger, P.C. (2002) Ethanol from Cellulose: A general review. In: Janick, J.; Whipkey J. *Trends in New Crops and New Uses*. Alexandria: ASHS Press.

Bastos, V. D. Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. BNDES- Setorial Rio de Janeiro, n.25; p 5-38; 14-22, 2007.

Baudel, H. M., Pré-tratamento e hidrólise. III Workshop tecnológico sobre: hidrólise para produção de etanol,2006.

Betancur, G. (2005). Avanços em biotecnologia de hemicelulose para produção de etanol por *Pichia stipitis*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Bhat, M.K. e Bhat, S. (1997) Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, v. 15, p. 583-620.

Brito, F.H.X.; Martins, L.C. e Silva, M.L.A (1999) Materiais lignocelulósicos: Uma visão ambiental. Disciplina: Microrganismos e o Meio Ambiente. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Brasil.

Calado, V. & Montgomery, D. (2003), Planejamento de Experimentos Usando o Statistica. Editorial E-papers Serviços Editoriales, Rio de Janeiro.

Caraméz, M. (1999) Produção de Endoxilanasas Termoestáveis por *Termomyces lanuginosus* IOC-4145 em Meio Semi-Sólido. Dissertação de Tese de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

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

Delgenes, J.P.; Moletta, R e Navarro, J.M. (1988) Continuous Production of Ethanol from Glucose, Xylose and Arabinose Mixture by a Flocculant Strain of *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letter*, v. 10, n. 10, p. 752-730.

Ereno, D. Álcool de Celulose. *Pesquisa Fapesp*, 133, p. 29-31, 2007.

Ferrer, A; Byers, F. M.; Sulbarán-de-Ferrer, B.; Dale B.E e Aiello, C. (2002) Optimizing Ammonia Processing Conditions to Enhance Susceptibility of Legumes to Fiber Hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98-100, p. 123-133.

Fonseca, E.F. (2003) Estudos para a Otimização da Produção Enzimática de Sorbitol e Ácido Glicônico. Tese de Doutorado. PEQ/COPPE. Universidade Federal de Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. Brasil.

Ghose, T. K. (1987) Measurement of Cellulase Activities. *Pure & Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p.257-268.

Hassuani, S.J. . (2005) Resíduos agrícolas – palha. In: Curso Internacional: “Energia na Indústria de Açúcar e Álcool”, Piracicaba. São Paulo: CTC – Copersucar. Brasil.

Klyosov, A. A. (1995a) Industrial Enzyme Engineering. Volume 1: Biomass conversion with cellulases. Disponível em: <http://aklyosov.home.comcast.net>. Acessado: Dezembro/ 2009.

Klyosov, A. A. (1995b) Industrial Enzyme Engineering. Volume 2: Principles of the enzymatic degradation of cellulose. Disponível em: <http://aklyosov.home.comcast.net>. Acessado: Dezembro/2009.

Kurabi, A.; Berlin, A.; Gilkes, N.; Kilburn, D.; Bura, R.; Robinson, J.; Markov, A.; Saddler, J. (2005) Enzymatic Hydrolysis of Steam-Exploded and Ethanol Organosolv-Pretreated Douglas-Fir by Novel and Commercial Fungal Cellulases. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 121-124, p. 219-230.

Lal, R. (2005) World crop residues production and implications of its use as a biofuel. Environment International, v. 31, p. 575-584.

Laureano-Perez, L. ; Teymori, F. ; Alizadeh, H. e Dale, B. E. (2005) Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 121-124, p. 1081-1099.

Leal, M. L. (1998). Reciclo Celular na Produção Contínua de Etanol a Partir de D-Xilose com uma Linhagem Flocculante de *Pichia stipitis*. Dissertação de Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Lee, J. (1997) Biological Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol. Journal of Biotechnology, v. 56, p. 1-24.

Lemos, J.L.S. (2001) Estudo da Produção de Xilanases por *Aspergillus awamori* em Bagaço de Cana. Dissertação de Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

Linde, M.; Galbe, M e Zacchi, G. (2006) Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Barley Straw. Lund University. 28th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Nashville, Tennessee.

Lynd, L.R.; Weimer, P.J.; Zyl, W.H.V e Pretorius, I.S. (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology And Molecular Biology Reviews. v. 66, n. 3, p. 506–577.

Lynd, L.R.; Zyl, W.H.V.; McBride, J. e Laser M. (2005) Consolidated Bioprocessing of Cellulosic Biomass: an Update. Biotechnology, v.16, p. 577–583.

Mapa - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2005) Plano nacional de agroenergia. Brasília: MAPA, p. 118. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acessado: Dezembro/2009.

Martin, C.; Galbe, M.; Nilverbrant, N. e Jönsson, L.J. (2002) Comparison of the Fermentability of Enzymatic Hydrolizates of Sugarcane Bagasse Pretreated by Steam Explosion Using Different Impregnating Agents. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 98-100, p. 699-715.

Menezes, T.J.B e Aguiar, L.C. (2002) Conversão Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, n. 16 Maio-Junho.

Moor, R.; Clark, D. e Vodopich, D. (1998) Botany Visual Resource Library. The McGraw-Hill Companies, Inc. Unite State.

Mosier, N. Wyman. C. Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y. ; Holtzapple, M.; Ladisch, M.; Ladisch, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, v.96, p.673-686, 2005.

Mussato, I.S e Roberto, I.C. (2002) Produção Biotecnológica de Xilitol a Partir da Palha de Arroz. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 28: 24-39

Mussato, I.S. (2002) Influência do Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Palia de Arroz na Produção de Xilitol por *Candida guilliermondii*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Brasil.

Neureiter, M.; Danner, H.; Thomasser, C.; Saidi, B. e Braun R. (2002) Dilute-Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse at Varying Conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98-100, p. 49-58.

Olsson, L. e Hahn-Hägerdal, B. (1996) Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates for Ethanol Production. *Enzyme Microbial Technology*, v. 18, p. 312 – 331.

Palmqvist, E. e Hahn-Hägerdal, B. (2000a) Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates. I: Inhibition and Detoxification. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 17-24.

Pan, X.J, Sano, Y. , 2000. Comparison of acetic acid lignin with milled Wood and alkaline lignins from wheat straw. *Holzforschung* 54, 61-65.

Pan, X.; Xie, D.; Gilkes, N.; Gregg, D.J. e Saddler, N.J. (2005) Strategies to Enhance the Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Softwood with High Residual Lignin Content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.121-124, p. 1069-1079.

Pereira, R.E. (2006) Avaliação do Potencial Nacional de Geração de Resíduos Agrícolas para Produção de Etanol. Dissertação de Mestrado Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Brasil.

Pereira Jr., N. (1991) Investigation of D-xylose Fermenting Yeast. Ph.D. Thesis. Department of Chemistry. The University of Manchester, U.K.

Pereira Jr., N.; Couto, Maria Antonieta Peixoto G.; Santa Anna, Lidia Maria Melo (2008). Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. *Series on Biotechnology* v. 2. Rio de Janeiro: Amigadigital. 46 p.

Philippidis, G.P e Hatzis, C. (1997) Biochemical Engineering Analysis of Critical Process Factors in the Biomass-to-Ethanol Technology. *Biotechnology Progress*, v. 13, p. 222-231.

Protocolo de Determinação de Carboidratos Estruturais e Lignina em Biomassa da NREL (National Renewable Energy Laboratory).

Rad, B.L. e Yazdanparast, R. (1998) Desorption of the Cellulase Systems of *Trichoderma reesei* and a *Botrytis* sp. from Avicel. *Biotechnology Techniques*, v. 12, n. 9, p. 693-696.

Rossel, C. V. (2005) O Setor Sucroalcooleiro e a Produção de Etanol. Transformações após o Protocolo de Kioto. Work Shop Brasil-Japão, Anais eletrônicos. São Paulo. Em: <http://www.cori.unicamp.br/BrasilJapao3>. Acessado em: Dezembro de 2009.

Salomão, A. e Poloni, G. (2007) Etanol: O Mundo Quer, O Brasil Tem. *Revista Exame*. Ed. 0870. Junho, p. 18-24.

Sassner, P.; Galbe, M e Zacchi, G. (2006) Bioethanol Production Based on Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated *Salix* at High Dry-Matter Content. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 756–762.

Schlittler, L.A.F.S (2006) Engenharia de um Bioprocesso para a Produção de Etanol de Bagaço de Cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Brasil.

Schuchardt, U. e Ribeiro, M.L. (2001) A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima?. *Química Nova*, v. 24, n. 2, p. 247-251.

Shleser, R. (1994) Ethanol Production in Hawaii: Processes, Feedstocks and Current Economic Feasibility of Fuel Grade Ethanol Production in Hawaii. Disponível em: www.hawaii.gov. Acessado: novembro/2009.

Sivers, M.V. e Zacchi, G. (1996) Ethanol from Lignocellulosics: A Review of the Economy. *Bioresource Technology*, v.56. p. 134-140.

Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. NREL, 14 p. 2005.

Sun, Y e Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a Review. *Bioresource Technology*, v. 83, n. 1, p. 1-11.

UNICA (União de Agroindústria Canavieira de São Paulo) (2005 e 2009). Dados históricos. Disponível em: <http://www.portalunica.com.br>. Acessado em : Dezembro/2009.

Vásquez, M. P., Vargas, G. J. et al. (2006). Evaluación del potencial biotecnológico del follaje de caña de azúcar para la producción de etanol, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Vásquez (2007) Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar.

Ververis, C.; Georghiou, K.; Danielidis, D.; Hatzinikolaou, D.G.; Santas, P.; Santas, R.; Corleti, V. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresource Technology*, 98: 296–301, 2007.

Vlasenko, E.Y.; Ding, H., Labavitch, J.M. e Shoemaker, S.P. (1997) Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Rice Straw. *Bioresource Technology*, v. 59, p. 109-119.

Xu F., Liu, Geng Z.C, Sun J. X, Sun R.C., Sun R.C., Hei, B.H., Lin L., Wu S.B., Je. J. (2005) Characterisation of degraded organosolv hemicelluloses from wheat straw. *Polymer Degradation and Stability* 91 (2006) 1880-1886.

Xu F., Sun J.X., Sun R.C., Fowler P., Baird M.S. (2005) Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. *Industrial Crops and Products* 23 (2006) 180-193.

Wingren, A.; Galbe, M. e Zacchi, G. (2003) Techno-Economic Evaluation of Producing Ethanol from Softwood: Comparison of SSF and SHF and Identification of Bottlenecks. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 1109-1117.

Wheals, A. Scanning electron micrograph of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Disponível em: <http://www.bath.ac.uk/biosci/wheals2.htm>. Acesso em : Dezembro/ 2009.

Zhao, J., Liming, X. (2010). Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells.