



Processo *organosolv* aplicado à
deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar
para produção de etanol de segunda
geração

Mariana de Oliveira Faber

Projeto Final de Curso

Orientador

Nei Pereira Jr., *PhD.*

Setembro de 2009

**PROCESSO *ORGANOSOLV* APLICADO À DESLIGNIFICAÇÃO
DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE
SEGUNDA GERAÇÃO**

Mariana de Oliveira Faber

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

Aprovado por:

Edélvio de Barros Gomes, *DSc*

Maria Antonieta P. G. Couto, *DSc*

Walber Carvalho Melo, *DSc*

Orientado por:

Nei Pereira Jr., *PhD.*

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Setembro de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

FABER, Mariana de Oliveira.

Processo *organosolv* aplicado à deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração / Mariana de Oliveira Faber. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2009.

xi, 54 p.; il.

(Projeto Final) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2009.

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

1. *Organosolv*. 2. Etanol de segunda geração. 3. Deslignificação. 4. Projeto Final (Graduação - UFRJ/EQ). 5. Nei Pereira Jr., *Ph.D.* I. Processo *organosolv* aplicado à deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração.

*Dedico este trabalho
a todos aqueles que acreditaram em mim,
que estiveram do meu lado,
me apoiando e me incetivando
ao longo desta jornada.*

*"Há um tempo em que é preciso
abandonar as roupas usadas,
que já tem a forma do nosso corpo,
e esquecer os nossos caminhos,
que nos levam sempre aos mesmos lugares.
É o tempo da travessia:
e, se não ousarmos fazê-la,
teremos ficado, para sempre,
à margem de nós mesmos."*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me dar forças, escutar minhas preces e estar sempre do meu lado nesta caminhada.

Agradeço ao Prof. Nei Pereira Jr. pela orientação, pela oportunidade e pelo conhecimento oferecidos.

À minha família, que é minha base, que me fez o sou e me ajudou a chegar até aqui. Ao meu pai, Alexandre, por todo esforço desempenhado, desde meus primeiros anos de escola, para eu tivesse a melhor educação possível. À minha mãe, Márcia, por seu amor incondicional, por suas orações, por seu apoio e amizade. Às minhas irmãs queridas, Carolina e Júlia, pela amizade, pelo companheirismo, pela preocupação, pelo amor de irmãs, pela presença insubstituível em todos os momentos.

Ao meu amor, Rafael, que segurou muitas “barras”, momentos de insegurança e que foi, acima de tudo, um grande amigo, um companheiro essencial, com a palavra certa na hora certa.

Aos amigos sempre presentes mesmo à distância: Viviane Abdu, Cecília Ramos, Valdete Raibolt, Thais Damião e Rafael Curi, aos amigos de todos os dias Roberta Peixoto, Gisele Huguet, Aline Siqueira, Leonardo Mattos, Renata Almeida, Lívia Sutana, Giovana Romeu e Jardel Domingos, Clara Freitas e Cecília Vale e também aos quase sempre presentes, mas não menos importantes Maurílio Mesquita, Viviane Ramos, Vítor Pereira e Bruno Christo.

À toda a equipe LADEBIO e principalmente Mariana Mello, Ludmylla Bastos, Daiana Neves, Walber Carvalho, Gabriel Betancur, Roberto Maeda, Luizão e Jorge. Ao meu “ajudante” indispensável sem o qual este trabalho não seria possível: Thiago da Silva Almeida.

Àquela que foi uma grande inspiração, uma maravilhosa orientadora e também uma amiga cuidadosa, Verônica Ferreira, muito obrigada pelo carinho, dedicação e orientação.

Resumo do Projeto Final apresentado à Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

**PROCESSO *ORGANOSOLV* APLICADO À DESLIGNIFICAÇÃO DO BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA
GERAÇÃO**

Mariana de Oliveira Faber

Setembro, 2009

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

Pesquisas atuais sinalizam a necessidade do desenvolvimento de processos de base biotecnológica que permitam a utilização dos resíduos já existentes, para a produção de bioetanol. No Brasil utiliza-se o caldo extraído da cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de etanol, gerando grandes quantidades de material lignocelulósico como resíduo. O bagaço de cana-de-açúcar pode ser utilizado para a produção de etanol, através de processos que promovam a extração dos açúcares constituintes das porções polissacarídicas. Existem três processos principais envolvidos na conversão do material lignocelulósico a etanol: pré-tratamento, hidrólise e fermentação. O pré-tratamento tem o objetivo de clivar seletivamente as ligações que unem as macroestruturas, desorganizando assim, as frações lignocelulósicas e adequando a matéria-prima às condições de transformação requeridas nas próximas etapas. Com o objetivo de disponibilizar a fração celulósica ao ataque enzimático, a deslignificação do material lignocelulósico é imprescindível. Dentre diversos métodos de deslignificação o processo *organosolv* se destaca por possibilitar o reaproveitamento dos agentes, diminuindo o custo do processo. O trabalho teve como objetivo a produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado por processo *organosolv*. Foram obtidos aproximadamente 18g/L de glicose após hidrólise enzimática das celuligninas deslignificadas com ácido acético/ácido fórmico. Adicionalmente, os resultados mostraram que o bagaço pré-tratado pode ser fermentado, produzindo 12g/L de etanol após 44h de SSF. Embora não otimizados, os resultados sinalizam para o desenvolvimento desta tecnologia de forma mais aprofundada.

Sumário

Capítulo 1. Introdução	1
Capítulo 2. Revisão Bibliográfica	5
2.1 O bagaço de Cana-de-açúcar como matéria-prima lignocelulósica	5
2.1.1 Celulose	7
2.1.2 Hemicelulose	9
2.1.3 Lignina	10
2.2 Etanol	12
2.3 Rotas de obtenção de Etanol	13
2.3.1 Rota convencional – 1ª geração	13
2.3.2 Etanol de 2ª geração	15
Pré-tratamento ácido	16
Deslignificação	17
explosão com CO_2	18
ozonólise	18
hidrólise alcalina	18
deslignificação oxidativa	18
Processo organosolv	18
Hidrólise enzimática	20
Fermentação	22
2.3.3 Tendências Tecnológicas	23
Hidrólise e Fermentação em Separado (SHF)	24
Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF)	25
Sacarificação e Co-Fermentação Simultânea (SSCF)	26
Bioprocesso Consolidado (CBP)	26
Capítulo 3. Justificativa e objetivos	28

3.1 Justificativa	28
3.2 Objetivos	29
3.2.1 objetivo geral	29
3.2.2 objetivos específicos	29
Capítulo 4. Materiais e Métodos	30
4.1 Microrganismo	30
4.2 Matéria-prima	30
4.3 Deslignificação <i>organosolv</i>	30
4.4 Hidrólise enzimática	32
4.5 SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation)	32
4.6 Métodos analíticos	33
4.7 Influência do pH na deslignificação	33
4.8 Avaliação da fermentabilidade da celulignina deslignificada por processo <i>organosolv</i>	35
4.9 Avaliação da reutilização dos solventes aplicados ao processo <i>organosolv</i>	35
Capítulo 5. Resultados e discussões	36
5.1. Deslignificação <i>organosolv</i>	36
5.2 Influência do pH na deslignificação	41
5.3 Avaliação da fermentabilidade da celulignina deslignificada por processo <i>organosolv</i>	43
5.4 Avaliação da reutilização dos solventes aplicados ao processo <i>organosolv</i>	45
Capítulo 6. Conclusões	49
Capítulo 7. Referências	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Polímeros constituintes dos materiais lignocelulósicos	6
Figura 2.1.1.1	Molécula de celobiose	7
Figura 2.1.1.2	Estrutura cristalina da celulose. Representação das ligações de hidrogênio entre cadeias (inter) e entre resíduos de glicose da mesma cadeia (intra)	8
Figura 2.1.2.1	Estrutura típica da hemicelulose	9
Figura 2.1.3.1	Estrutura da lignina	10
Figura 2.1.3.2	Precursores básicos na formação da molécula de lignina	11
Figura 2.1.3.3	Principais unidades aromáticas presentes na molécula de lignina	12
Figura 2.2.1	Evolução do mercado brasileiro de etanol	13
Figura 2.3.1.1	Diagrama de blocos do processo de produção de etanol de 1ª geração	14
Figura 2.3.2.1	Diagrama de blocos da produção de etanol de segunda geração	16
Figura 2.3.2.2	<i>Organosolv</i> inserido na produção de etanol de segunda geração	19
Figura 2.3.2.3	Representação esquemática da hidrólise de celulose pelo sistema celulolítico	21
Figura 2.3.3.1	Diagrama de blocos representativo do processo SHF	24
Figura 2.3.3.2	Diagrama de blocos representativo do processo SSF	25
Figura 2.3.3.3	Diagrama de blocos representativo do processo SSCF	26
Figura 2.3.3.4	Diagrama de blocos representativo do processo	

CBP	27
Figura 4.3.1	Sistema de deslignificação 31
Figura 4.6.1	Representação esquemática do tratamento das amostras 33
Figura 5.1.1	Fração líquida após deslignificação <i>organosolv</i> 37
Figura 5.1.2	Espectros de absorvância das frações resultantes dos diferentes <i>organosolv</i> 38
Figura 5.1.3	Fração sólida após deslignificação <i>organosolv</i> – celulignina pré-tratada comparada com celulignina sem tratamento de deslignificação 39
Figura 5.1.4	Frações líquida e sólida após deslignificação com ácido acético/ ácido fórmico 40
Figura 5.1.5	Frações líquida e sólida após deslignificação com acetona 40
Figura 5.1.6	Frações líquida e sólida após deslignificação com etanol 41
Figura 5.2.1	Concentração de glicose após 24h e 48h de hidrólise enzimática da celulignina pré-tratada por diferentes processos <i>organosolv</i> 42
Figura 5.3.1	Perfis cinéticos de produção de etanol 44
Figura 5.4.1	Perfis cinéticos de produção de etanol 46
Figura 5.4.2	Perfis cinéticos de produção de etanol para SSF1 47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.2	Vantagens e desvantagens do processo <i>organosolv</i> em relação à hidrólise alcalina	20
Tabela 4.3.1	Condições experimentais dos processos de deslignificação <i>organosolv</i>	31
Tabela 4.7.1	Condições experimentais	34

Capítulo 1

Introdução

A escassez das reservas de petróleo e a iminência das mudanças climáticas, agravada pela ação dos gases de queima que contribuem para o efeito estufa, impulsionam o desenvolvimento de fontes alternativas de energia.

Gás natural e carvão mineral são fontes fósseis de energia capazes de substituírem o petróleo em disponibilidade, porém não se apresentam como potenciais matérias-primas para a indústria química e possuem uma característica indesejável semelhante à do petróleo: o perfil poluente dado pelas altas taxas de emissão de CO₂, CO e gases sulfurados e nitrogenados oriundos de sua queima ou transformação. Cabe ressaltar que o gás natural, menos poluente, é pauta de discussões políticas internacionais sobretudo devido à sua distribuição não homogênea (MAST, 2005).

Neste contexto, os processos biotecnológicos, inseridos no conceito de biorrefinaria, oferecem uma ampla gama de alternativas para a obtenção de diferentes substâncias de interesse industrial, que podem ser substitutos de derivados do petróleo.

Entre os biocombustíveis destaca-se o etanol como substituto da gasolina no setor do transporte. Em março de 2008, o consumo de etanol produzido a partir da cana-de-açúcar ultrapassou o de gasolina e passou a representar mais de 50% do combustível utilizado nos veículos leves no Brasil. Sua produção e utilização ajudam a reduzir as emissões de gases causadores do efeito estufa em até 90% em comparação com a gasolina, e os motoristas podem comprá-lo em praticamente qualquer posto de combustíveis do país (UNICA, 2007).

Em comparação a outros países, o Brasil possui uma Matriz Energética bastante limpa. A participação das energias renováveis no total da energia primária ofertada internamente é de quase 45%, enquanto nos

demais países essa participação corresponde, em média, a cerca de 13% (MAPA, 2007).

A tradição agroenergética brasileira data da década de 1920, em projetos do antigo Ministério da Agricultura, Indústria e Comércio, mas somente em 1927 foi realizada a primeira experiência de uso do etanol como combustível. Desde então, o País desenvolveu uma larga experiência na produção e uso de etanol, especialmente com a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), em 1975. Em 1978 foi lançado o 1º carro a álcool no Brasil – Fiat 147.

No ano de 1986 houve um Boom nos lançamentos de automóveis a álcool, mas devido a problemas técnicos nos motores houve uma retração na venda destes automóveis desencadeando a “crise do álcool”, que alcançou seu apogeu em 1991 quando foram retirados os subsídios do Proálcool. Na tentativa de minimizar os efeitos da crise, na década de 90, o álcool passou a ser adicionado à gasolina.

Novo aumento na produção de álcool foi impulsionado pelo lançamento dos carros *flex* no mercado brasileiro em 2003. Em 2006 o consumo de álcool atingiu 18% da matriz de combustíveis veiculares (incluindo o diesel). Em abril de 2008 o etanol combustível superou o consumo de gasolina e em agosto do mesmo ano a frota de automóveis e veículos comerciais leves tipo “flex” atingiu a marca de 6,2 milhões de veículos, representando 23% da frota automotriz do Brasil.

Desde a década de 1970, o setor sucroenergético brasileiro vive em contínua evolução tecnológica. Hoje, a cana-de-açúcar é o insumo básico de uma ampla variedade de produtos de valor agregado, que inclui alimentos, rações animais, biocombustíveis e eletricidade, provenientes de biorrefinarias modernas e integradas, que produzem açúcar, etanol e bioeletricidade. No futuro próximo, os bioplásticos entrarão nessa lista (UNICA, 2008).

A participação da cana-de-açúcar leva em consideração não apenas o álcool consumido pelos veículos automotores, mas também a utilização do bagaço nas usinas. O bagaço é o resíduo sólido da produção

de açúcar e álcool, destinado, atualmente, à geração de energia, nas formas térmica, mecânica e elétrica, mas que pode ter um destino mais nobre: produção de etanol de segunda geração.

Para evitar a expansão desmedida de cultivos para a produção de etanol, diminuir a quantidade de resíduos já produzidos e oferecer novas alternativas tecnológicas, pesquisas atuais sinalizam a necessidade do desenvolvimento de processos de base biotecnológica que permitam a utilização dos resíduos já existentes, para a produção de etanol. Dentre os possíveis resíduos, os materiais lignocelulósicos, gerados da própria atividade agrícola e agro-industrial, possuem potencial suficiente para tornarem-se matéria-prima para a produção de etanol.

No Brasil utiliza-se o caldo extraído da cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de etanol, gerando grandes quantidades de material lignocelulósico como resíduo. O bagaço de cana-de-açúcar pode ser utilizado neste processo, através de etapas que promovem a extração dos açúcares constituintes das porções polissacarídicas, com baixa produção de substâncias tóxicas.

A biomassa lignocelulósica é constituída de três importantes porções poliméricas: celulose (cerca de 40 a 60% do peso total), hemicelulose (cerca de 20 a 40% do peso total) e lignina (cerca de 10 a 20% do peso total). Celulose e hemicelulose são frações hidrolisáveis por enzimas, tendo como produtos de hidrólise açúcares fermentáveis, a lignina é a fração que reveste as demais frações conferindo resistência ao material lignocelulósico, deste modo reduzindo a eficiência da hidrólise. Essa resistência constitui uma barreira ao ataque enzimático, de modo que as enzimas celulásicas não têm acesso à celulose (LYND, 2002).

Segundo Mosier *et al.* (2005), existem três processos principais envolvidos na conversão do material lignocelulósico a etanol: pré-tratamento, hidrólise e fermentação. O pré-tratamento tem o objetivo de clivar seletivamente as ligações que unem as macroestruturas, desorganizando assim, as frações lignocelulósicas e adequando a matéria-prima às condições de transformação requeridas para uma ação eficiente

das enzimas a serem empregadas; a hidrólise da celulose gera açúcares redutores fermentáveis pelo microrganismo e na fermentação esses açúcares são convertidos em etanol.

O etanol produzido a partir do processamento de resíduos agroindustriais é denominado etanol de segunda geração. A tecnologia de produção do etanol de segunda geração ainda não foi totalmente consolidada, pois ainda devem ser superadas duas barreiras importantes: a redução da carga enzimática aplicada ao processo de hidrólise do material lignocelulósico e a deslignificação do mesmo.

Explosão com amônia, explosão com CO₂, ozonólise, hidrólise alcalina e deslignificação oxidativa são alguns métodos tradicionais utilizados para promover a deslignificação de materiais lignocelulósicos.

O processo *organosolv* destaca-se como substituinte dos métodos mais tradicionais de deslignificação por apresentar vantagens como reciclo, reutilização e reaproveitamento do solvente, condições brandas de operação, catalisadores mais viáveis economicamente ou até mesmo a ausência de catalisadores.

No presente estudo, pretende-se desenvolver um processo *organosolv* com a finalidade de remover lignina do bagaço de cana-de-açúcar proveniente de hidrólise ácida, adequando-o às etapas subsequentes para a produção de etanol de segunda geração.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1 O bagaço de Cana-de-açúcar como matéria-prima lignocelulósica

A cana-de-açúcar é a matéria-prima mais competitiva para a produção de etanol com as tecnologias existentes. Apresenta vantagens consideráveis em termos de balanços energético e ambiental, produtividade e eficiência em termos de custos sobre alternativas como o milho, o trigo e a beterraba. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. A produção do ano-safra de 2007/08 atingiu um volume recorde de cerca de 496 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, processados em cerca de 350 usinas sediadas em todo o País. Ao final da safra 2007/08, a cana-de-açúcar ocupava 7,8 milhões de hectares, ou 2,2% do total de terras cultiváveis do Brasil (MAPA, 2008). Ao final do processamento da cana-de-açúcar, uma grande quantidade de resíduos lignocelulósicos é gerada, em especial bagaço e palha de cana-de-açúcar.

Os materiais lignocelulósicos possuem um alto conteúdo de carboidratos (cerca de 70% da massa) constituindo-se em uma fonte abundante e renovável de matéria-prima que pode ser utilizada em processos biotecnológicos. Estes materiais são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas basicamente de hemicelulose e celulose, entremeadas por uma macromolécula composta por álcoois aromáticos, a lignina, que se encontra unida por ligações covalentes e de hidrogênio (LEE, 1997), conforme ilustrado na Figura 2.1. Em menores proporções podem ser encontradas também resinas, taninos, ácidos graxos, fenóis, compostos nitrogenados e sais minerais, principalmente, de cálcio, potássio e magnésio (SHLESER, 1994).

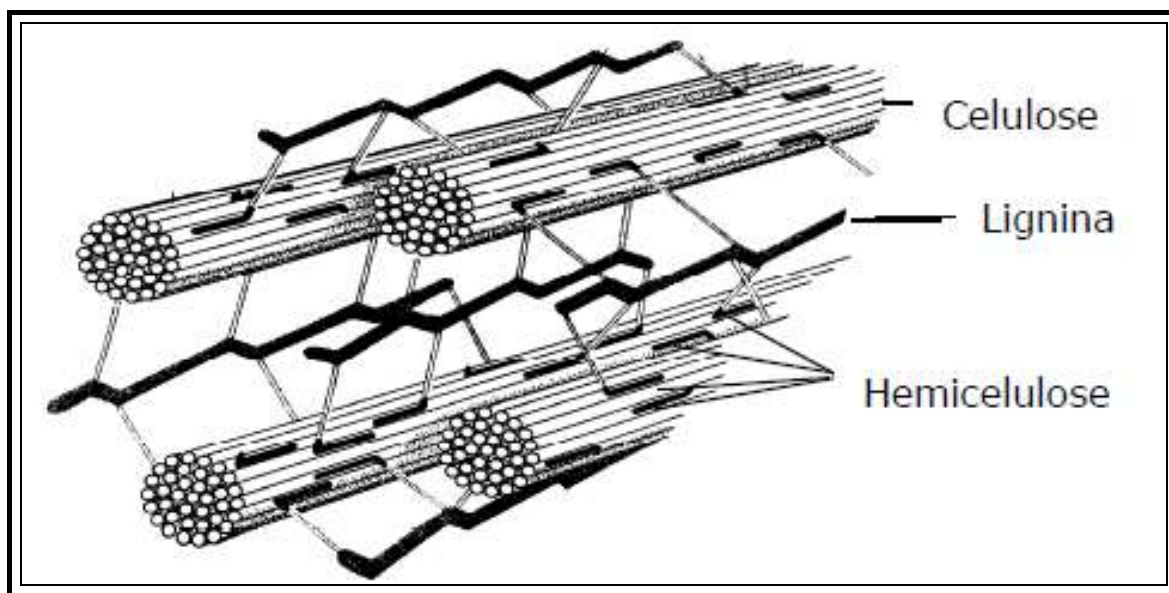


Figura 2.1: Polímeros constituintes dos materiais lignocelulósicos.

Fonte: LEE *et al.* (2007).

Segundo Lamonica (2005), a palha e o bagaço compõem, em média, 28% do peso da cana de açúcar (280 kg de bagaço por tonelada de cana com 50% de umidade). Sua composição elementar é 44,6% de carbono, 5,8% de hidrogênio, 44,5% de oxigênio, 0,6% de nitrogênio, 0,1% de enxofre e 4,4% de outros elementos (SIMÕES, 2005).

A biomassa lignocelulósica é constituída de três importantes porções poliméricas: celulose (cerca de 40 a 60% do peso total), hemicelulose (cerca de 20 a 40% do peso total) e lignina (cerca de 10 a 20% do peso total). A distribuição destes componentes lignocelulósicos na parede celular do vegetal é dependente da espécie e de seu estágio de crescimento e desenvolvimento (LYND, 2002).

A tendência dos estudos atuais é desenvolver processos que permitam um aproveitamento mais racional do bagaço de cana por meio da produção biotecnológica de substâncias de interesse industrial como: etanol, xilitol, ácido succínico, ácido láctico, entre outras. Para processos que utilizem resíduos lignocelulósicos é necessária uma etapa na qual sejam liberados os glicídios constituintes das diferentes frações hemicelulósica e celulósica, denominada pré-tratamento ou hidrólises

química e/ou enzimática, que seja economicamente viável e permita alta eficiência de extração dos glicídios, baixa degradação dos açúcares e diminuição na produção de inibidores (Sun & Cheng, 2002).

2.1.1 Celulose

A celulose é o material orgânico mais abundante na natureza, sua função é estrutural, sendo o principal constituinte da parede celular dos vegetais. É um homopolissacarídeo linear, formado por unidades de β -D-glucopirranose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 e resultando em um polímero de alto peso molecular.

A fração celulósica (40%-60% da matéria seca) é um polímero linear do dímero glicose-glicose (celobiose, figura 2.1.1.1), rígido e difícil de ser quebrado; sua hidrólise gera glicose, um açúcar de seis carbonos, cuja fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* já é bem conhecida (Bioetanol de cana-de-açúcar, 2008).

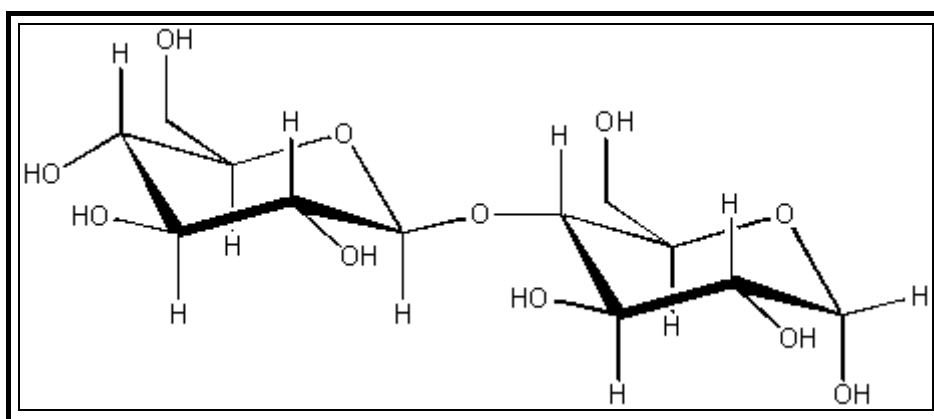


Figura 2.1.1.1: Molécula de celobiose.

As cadeias de celulose são ligadas por ligações inter e intra-moleculares do tipo pontes de hidrogênio ou forças de van der Waals (figura 2.1.1.2), formando feixes de regiões cristalinas (organizadas) intercaladas com regiões amorfas (desordenadas). A estrutura altamente ordenada e a cristalinidade da molécula de celulose a tornam recalcitrante

à hidrólise. A hidrólise da celulose é uma etapa muito importante na conversão de biomassas renováveis em combustíveis (LEE, 2008). Os métodos de pré-tratamento têm como objetivo desorganizar as fibras de celulose, causando a diminuição da cristalinidade e, conseqüentemente, facilitando o acesso das enzimas do complexo celulolítico às fibras.

A hidrólise da celulose por enzimas celulolíticas - as celulasas - resulta na produção final de glicose. Porém, por serem proteínas, as celulasas não conseguem transpor com facilidade a barreira da lignina das células vegetais e, dessa forma, o difícil acesso destas enzimas às fibras de celulose constitui o principal problema para desencadeamento desse processo de degradação (LEE, 2008).

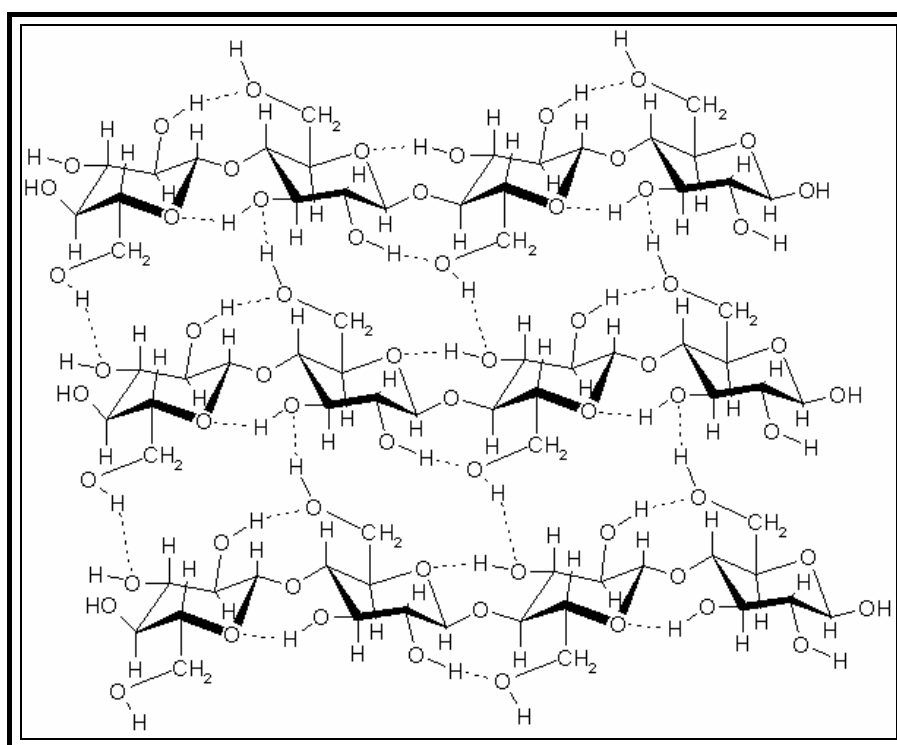


Figura 2.1.1.2: Estrutura cristalina da celulose. Representação das ligações de hidrogênio entre cadeias (inter) e entre resíduos de glicose da mesma cadeia (intra).

A celulose é organizada em fibras que são envolvidas por uma matriz de lignina e hemicelulose.

2.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é formada por uma estrutura complexa de carboidratos poliméricos, incluindo xilana, xiloglicana (heteropolímero de D-xilose e D-glicose), glicomanana (heteropolímero de D-glicose e D-manose), galactoglicomanana (heteropolímero de D-galactose, D-glicose e D-manose) e arabinogalactana (heteropolímero de D-galactose e arabinose), (SHALLOM et al., 2003). Xilana é o principal componente da fração hemicelulósica e o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (COLLINS et al., 2005). A figura 2.1.2.1 mostra a estrutura simplificada da molécula de hemicelulose.

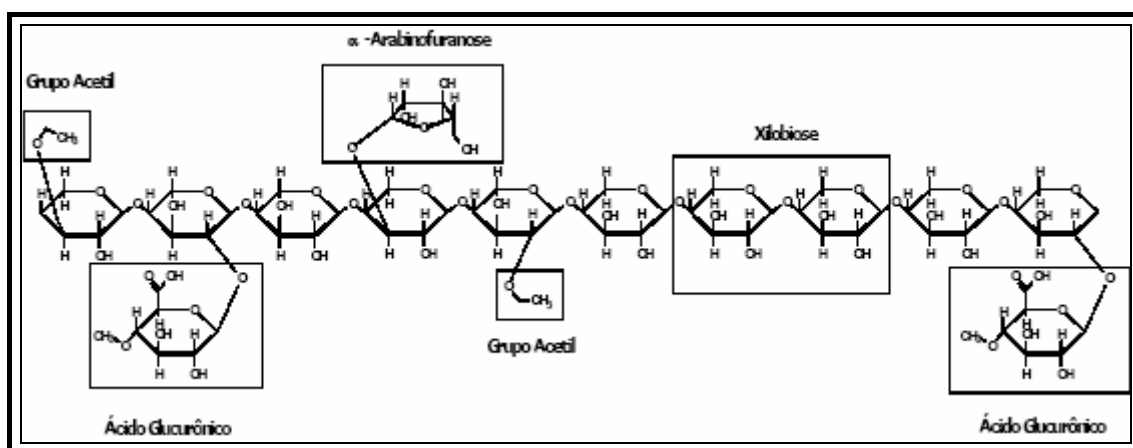


Figura 2.1.2.1: estrutura típica da Hemicelulose

Fonte: Mussatto, 2002.

A fração hemicelulósica (20%-40%), em geral, é constituída de uma cadeia principal de xilose (ligações β -1,4) com várias ramificações de manose, arabinose, galactose, ácido glucurônico etc. É importante lembrar que o termo hemicelulose não designa um composto químico definido, mas sim uma classe de componentes poliméricos presentes em vegetais fibrosos, possuindo, cada componente, propriedades peculiares.

A hemicelulose é muito mais fácil de ser hidrolisada do que a celulose, mas a fermentação dos açúcares de cinco carbonos (pentoses) ainda não é tão desenvolvida quanto os processos envolvendo a glicose (Bioetanol de cana-de-açúcar, 2008).

2.1.3 Lignina

A Lignina, macromolécula rica em aromáticos mais abundante da Terra, presente nos materiais lignocelulósicos em cerca de 10 a 20% da massa total (LYND, 2002), é composta basicamente por unidades de fenilpropano, formando uma molécula tridimensional e amorfa, como mostra a figura 2.1.3.1.

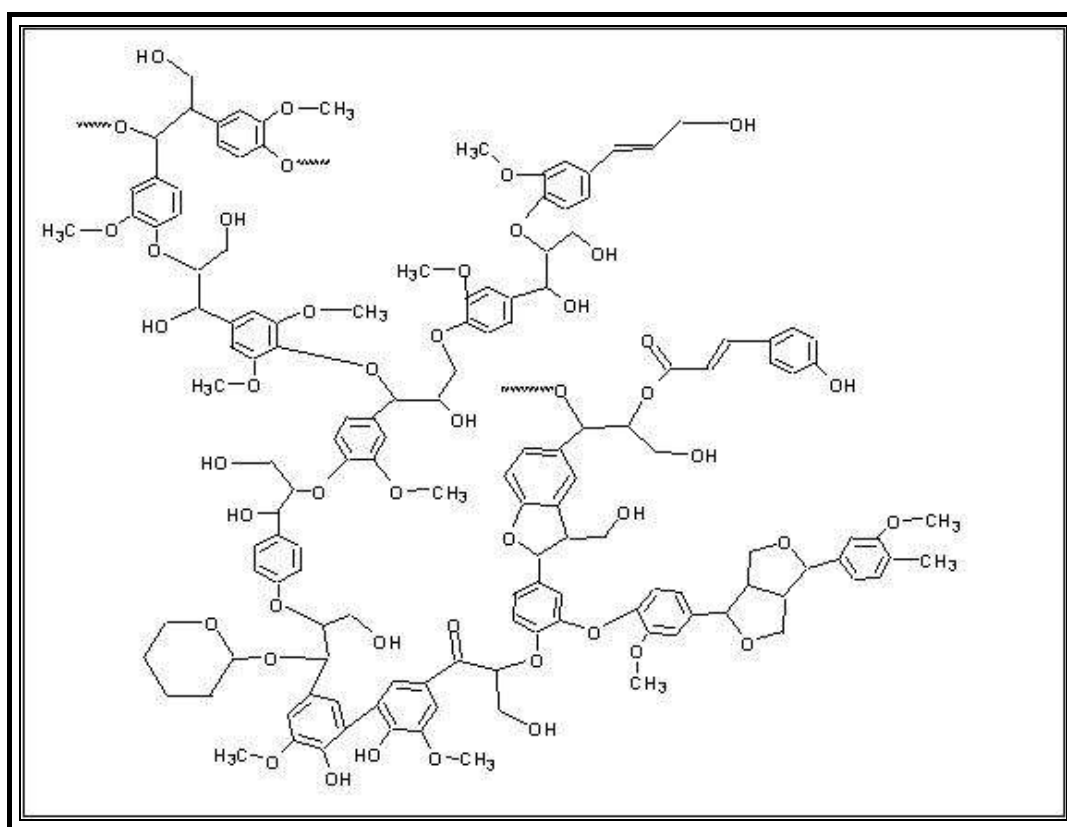


Figura 2.1.3.1 : Estrutura da Lignina

Apesar de ser um composto macromolecular aromático, a lignina difere dos outros componentes presentes na biomassa do vegetal, na medida em que sua estrutura tridimensional não possui ligações repetitivas entre os resíduos monoméricos constituintes da macromolécula (D'ALMEIDA, 1988).

O acoplamento das unidades de fenilpropano ocorre de forma aleatória, de acordo com a biossíntese da lignina, que se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes alcoóis cinâmicos

precursores: álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (FENGEL E WEGENER, 1989). A figura 2.1.3.2 mostra a estrutura dos precursores da molécula de lignina.

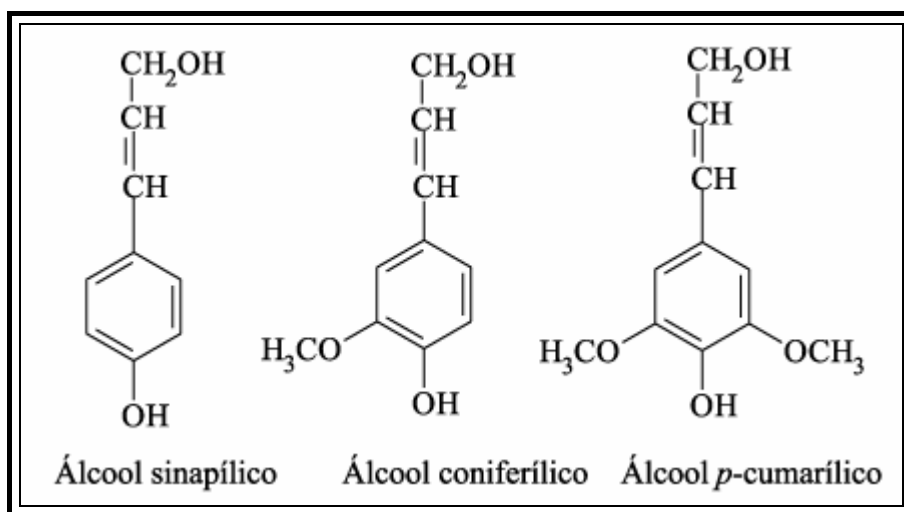


Figura 2.1.3.2: Precursores básicos na formação da molécula de lignina

Algumas ligninas consistem de polímeros fenilpropanóides, da parede celular, altamente condensados e muito resistentes à degradação. Eles são compostos de unidades *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S) (Figura 2.1.3.3), em proporções diferentes, de acordo com sua origem.

A lignina 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. A maior parte da lignina encontra-se na parede celular, onde se entrelaça com a hemicelulose, formando uma matriz que envolve as fibras de celulose.

Devido à sua complexidade estrutural, a lignina apresenta-se como uma barreira à ação das celulasas e hemicelulasas. Por este motivo tecidos lignificados resistem ao ataque por microrganismos e à hidrólise enzimática (D'ALMEIDA, 1988).

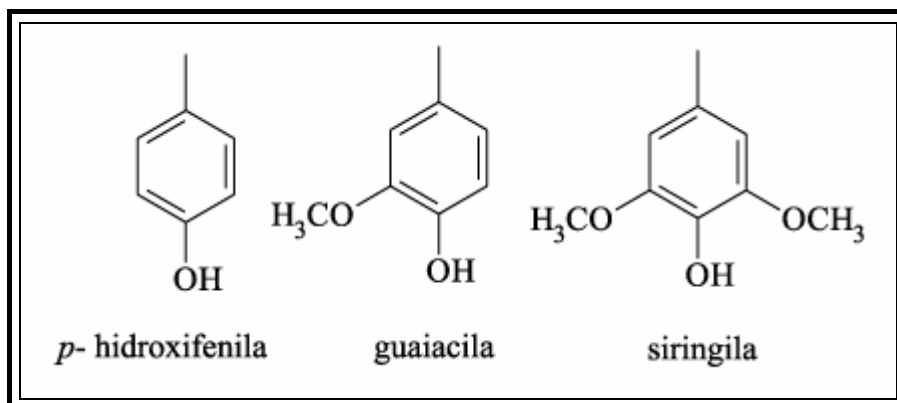


Figura 2.1.3.3: Principais unidades aromáticas presentes na molécula de lignina

A remoção da lignina dos materiais lignocelulósicos é de grande interesse tecnológico visto que esta fração dificulta a hidrólise enzimática da celulose, reduzindo a oferta de açúcares fermentáveis e o rendimento do processo de produção do etanol de segunda geração.

Apesar de ser possível produzir diversos produtos com base na lignina, atualmente o foco dos estudos tem se voltado para o uso desse material como fonte de energia para os processos, o que garantiria a auto-suficiência e, eventualmente, possibilitaria a exportação da energia elétrica excedente. Naturalmente, essa situação é positiva tanto para a viabilidade econômica da tecnologia quanto para os quesitos ambientais, já que reduziria a dependência por recursos energéticos fósseis externos (Bioetanol de cana-de-açúcar, 2008).

2.2 Etanol

O etanol, também chamado de álcool etílico, é produzido no Brasil quase que exclusivamente pela fermentação e destilação do caldo de cana e do melaço, resíduo da produção de açúcar. Usado de diversas formas há milhares de anos, emergiu no Brasil a partir de 1975 como combustível para motores de combustão interna. Em 2008, o etanol ultrapassou a gasolina e já representa mais de 50% do total de combustível consumido pelos veículos leves que circulam no País, segundo a União da indústria de

cana-de-açúcar (UNICA, 2008). A figura 2.2.1 apresenta a evolução do mercado de etanol.

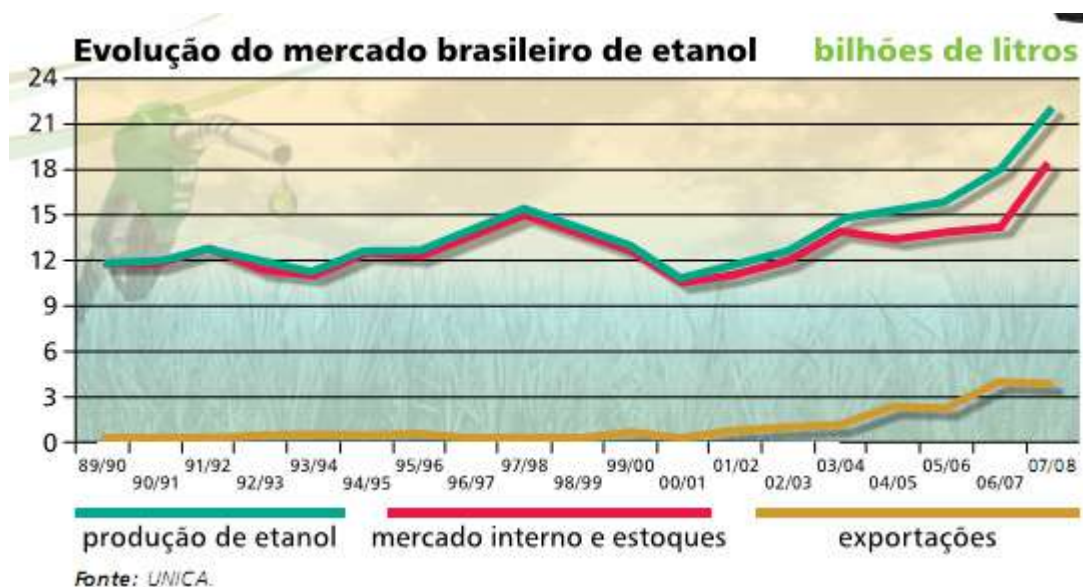


Figura 2.2.1: Evolução do mercado brasileiro de etanol

Fonte: UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar

2.3 Rotas de obtenção de Etanol

2.3.1 Rota convencional de produção do etanol – 1ª geração

No Brasil, etanol combustível é gerado pela fermentação do caldo de cana-de-açúcar, fermentável pelo microrganismo *Saccharomyces cerevisie* (figura 2.3.1.1). As vantagens da produção de etanol são decorrentes de importantes avanços tecnológicos pelos quais passou a cultura da cana-de-açúcar ao longo de sua história recente, que envolveram melhoramento genético, mecanização agrícola, gerenciamento, controle biológico de pragas, reciclagem de efluentes e práticas agrícolas (CGEE, 2005).

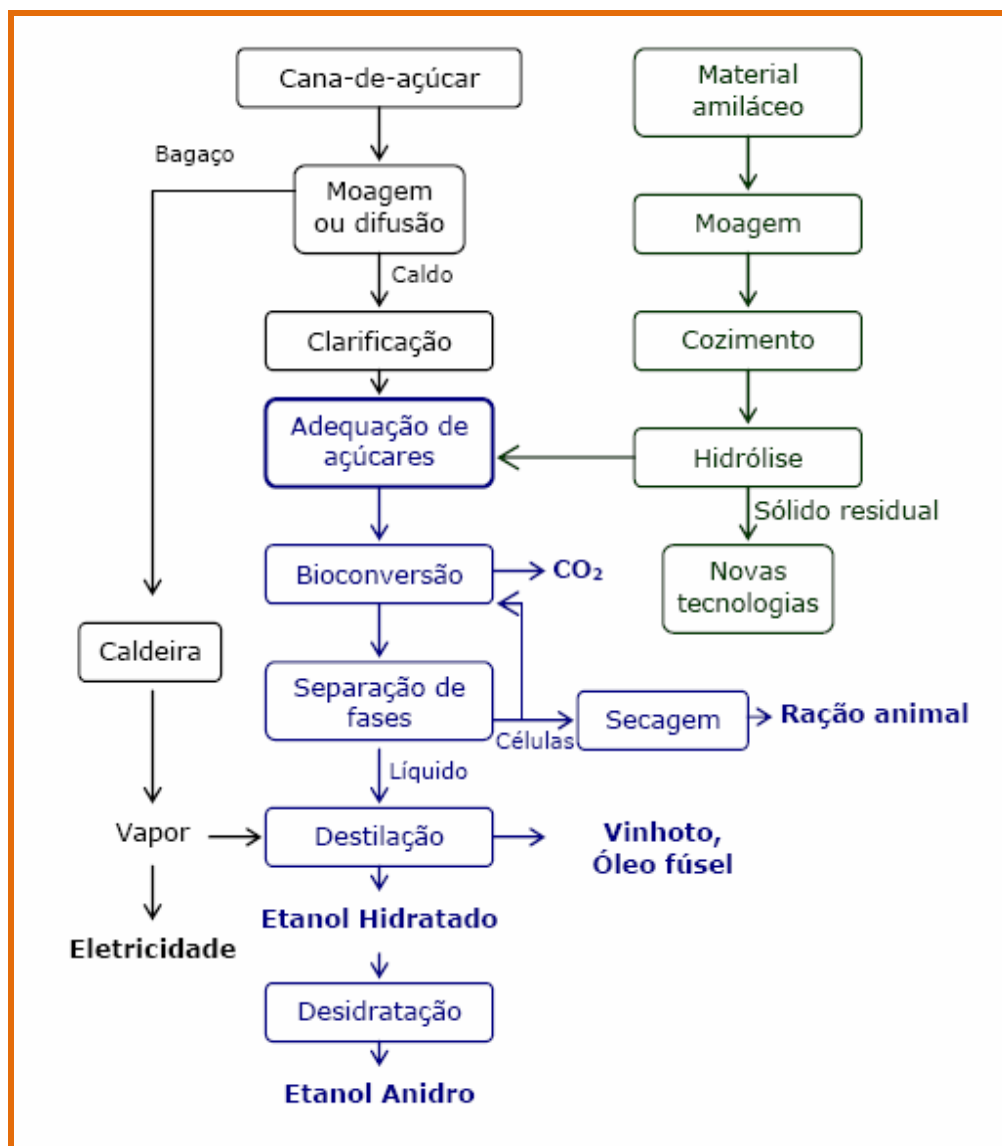


Figura 2.3.1.1: Diagrama de blocos do processo de produção de etanol de 1ª geração.

Os avanços na mecanização foram lentos na área do plantio, mas importantes no segmento de colheita, em decorrência da extinção das queimadas nos canaviais imposta pela legislação ambiental, que possibilitou a redução de custos e ganhos de qualidade (CGEE, 2005).

O processo de produção do etanol da cana propriamente dito compreende as seções de recepção, preparo e moagem, tratamento do caldo, fabricação do açúcar e destilaria de álcool, além das utilidades, disposição de efluentes e estocagem de produtos.

Na área de recepção, embora não empregada por muitas usinas brasileiras, há tecnologias disponíveis embutidas em equipamentos,

capazes de reduzir os teores de impurezas contidos na cana recebida que causariam problemas de processamento, de qualidade dos produtos e de custos de manutenção. A tecnologia da fase de preparo também está disponível. A extração do caldo, por seu turno, utiliza processo de moagem que passou por desenvolvimentos tecnológicos que garantem expressivos ganhos de eficiência.

Na fase de tratamento do caldo, está em desenvolvimento nova tecnologia capaz de gerar um produto (mosto) livre de outras substâncias, que permite fermentação alcoólica estável, com alto rendimento e produtividade. Por fim, as tecnologias dos processos convencionais de fermentação alcoólica com reciclo de fermento (contínua em múltiplos estágios ou em batelada alimentada) estão consolidadas, ainda que apresentem potencial de aperfeiçoamento para melhoria de desempenho, ganhos de rendimento, produtividade, maior estabilidade operacional e menor consumo energético (CGEE, 2005).

2. 3. 2 Etanol de 2ª geração

Diferentemente do etanol convencional, o bioetanol pode ser feito com base em materiais da biomassa lignocelulósica. O etanol de segunda geração é aquele produzido a partir do processamento de resíduos da produção do etanol convencional. O bagaço de cana-de-açúcar pode ser utilizado para a produção de etanol, desde que sejam desenvolvidos processos que permitam a extração dos açúcares constituintes das porções polissacarídicas, com a produção reduzida de substâncias tóxicas.

Segundo Mosier *et al.* (2005), o processamento de materiais lignocelulósicos para produzir etanol consiste em três etapas básicas: pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação.

O diagrama de blocos da produção de etanol de segunda geração pode ser observado na figura 2.3.2.1.

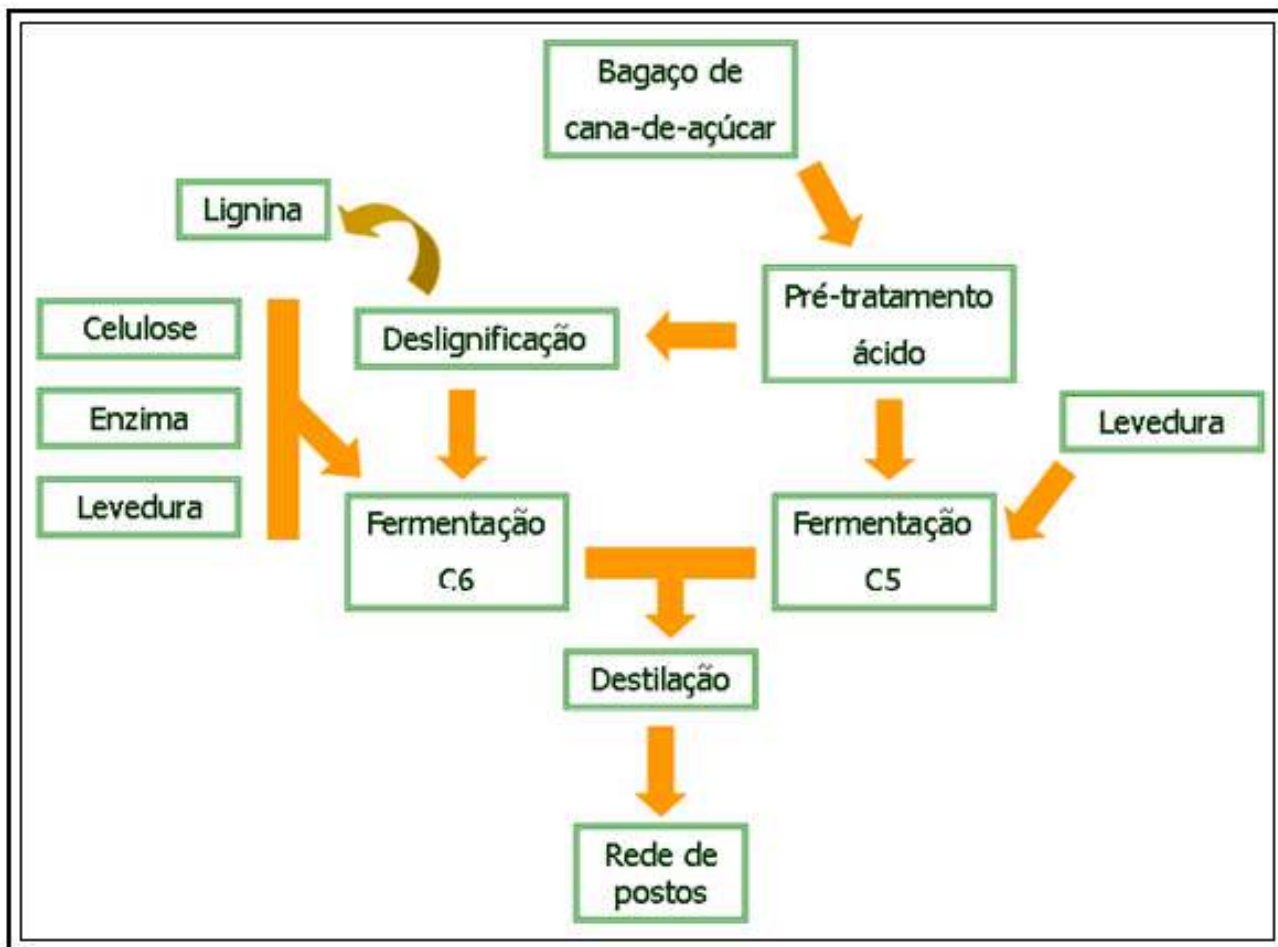


Figura 2.3.2.1: Diagrama de blocos da produção de etanol de segunda geração

Fonte: Adaptado de

<http://www.biodieselbr.com/energia/alcool/bioetanol-etanol-lignocelulose.htm>, (acesso em abril/2009)

Pré-Tratamento Ácido

O objetivo do tratamento ácido é remover a fração hemicelulósica do material. O líquido gerado (hidrolisado) é rico em xilana e xilose, enquanto o sólido é rico em lignina e celulose, muitas vezes denominado celulignina.

Ácidos concentrados como HCl e H₂SO₄ têm sido utilizados para tratar materiais lignocelulósicos. Embora sejam poderosos agentes para a hidrólise da celulose, são tóxicos, corrosivos, perigosos e requerem reatores que sejam resistentes à corrosão. Além disso, o ácido

concentrado deve ser recuperado após a hidrólise para tornar o processo economicamente viável (SIVERS & ZACCHI, 1995).

A hidrólise com ácido diluído tem sido desenvolvida com sucesso para o pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos. À temperatura moderada ocorre sacarificação direta com baixo rendimento devido à decomposição do açúcar.

Recentemente, foram desenvolvidos processos de hidrólise com ácido diluído utilizando condições menos severas para se alcançar altos rendimentos de conversão de xilana a xilose. Existem dois tipos principais de processos de pré-tratamento com ácido diluído: sob alta temperatura (superior a 160 °C), processo de fluxo contínuo que carrega poucos sólidos (5-10% peso de substrato/peso da mistura reacional), e sob baixa temperatura (inferior a 160 °C), que carrega alta carga de sólidos (10-40%). Embora este tipo de pré-tratamento possa melhorar significativamente a hidrólise de celulose, o seu custo é geralmente mais elevado que de alguns processos físico-químicos, como *steam explosion* ou *AFEX* e a neutralização do pH é necessária para os processos de hidrólise enzimática, *downstream* ou processos de fermentação subsequentes (SUN & CHENG, 2002).

Deslignificação

A deslignificação do material lignocelulósico é de extrema importância para o sucesso do processo de produção do etanol de segunda geração. Esta operação visa disponibilizar o material celulósico à hidrólise enzimática através da remoção da lignina. A lignina encontra-se envolvendo as fibras de celulose, dificultando o acesso às enzimas e reduzindo a eficiência de hidrólise.

Explosão com amônia, explosão com CO₂, ozonólise, hidrólise alcalina, deslignificação oxidativa e processo *organosolv* são os principais métodos utilizados para promover a deslignificação.

Explosão com CO₂ : Neste processo, o material é impregnado com CO₂ que se transforma no correspondente ácido e incrementa o processo hidrolítico.

Ozonólise: A ozonólise pode ser utilizada para degradar lignina e hemicelulose de diversos materiais lignocelulósicos, como palha de trigo, bagaço, amendoim, pinho, palha de algodão e serragem. Este processo apresenta as seguintes vantagens: remove a lignina efetivamente; não produz resíduos tóxicos no processo *downstream* e as reações ocorrem em temperatura e pressão ambientes. No entanto, uma grande quantidade de ozônio é necessária, tornando o processo oneroso (SUN & CHENG, 2002).

Hidrólise alcalina: 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. O tratamento com NaOH diluído provoca inchaço, levando a um aumento da área superficial interna; diminuição do grau de polimerização; redução da cristalinidade; separação estrutural das ligações entre lignina e carboidratos; e alteração da estrutura da lignina. A digestibilidade da madeira tratada com NaOH pode aumentar de 14% para 55% com a diminuição do teor de lignina de 24-55% para 20% (SUN & CHENG, 2002).

Deslignificação oxidativa: Neste processo, enzimas peroxidases são utilizadas para biodegradar a lignina em presença de H₂O₂ aumentando a suscetibilidade das fibras a posteriores processos de hidrólise.

Processo organosolv: No processo *organosolv*, um solvente orgânico ou uma mistura aquosa de solventes orgânicos com ácidos inorgânicos (HCl ou H₂SO₄) é usada para quebrar as ligações internas da lignina e hemicelulose. Os solventes orgânicos utilizados no processo

incluem metanol, etanol, acetona e álcool tetrahidrofurfural (CHUM, 1988). Ácidos orgânicos como ácido oxálico, ácido acético, ácido fórmico, ácidos salicílico e acetilsalicílico também podem ser usados como agentes no processo *organosolv*. Sendo o processo utilizado em temperaturas mais brandas, adição do catalisador é desnecessária para uma satisfatória deslignificação. Normalmente, um alto rendimento de xilose pode ser obtido com a adição de ácido. Os solventes utilizados no processo têm de ser drenados do reator, evaporados, condensados e reciclados para reduzir o custo. A remoção de solventes do sistema é necessária, visto que estes podem inibir o crescimento de organismos, a hidrólise enzimática e a fermentação (SARKANEN, 1980).

A Figura 2.3.2.2 mostra o Fluxograma da produção de etanol de segunda geração quando o processo *organosolv* é utilizado na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar.

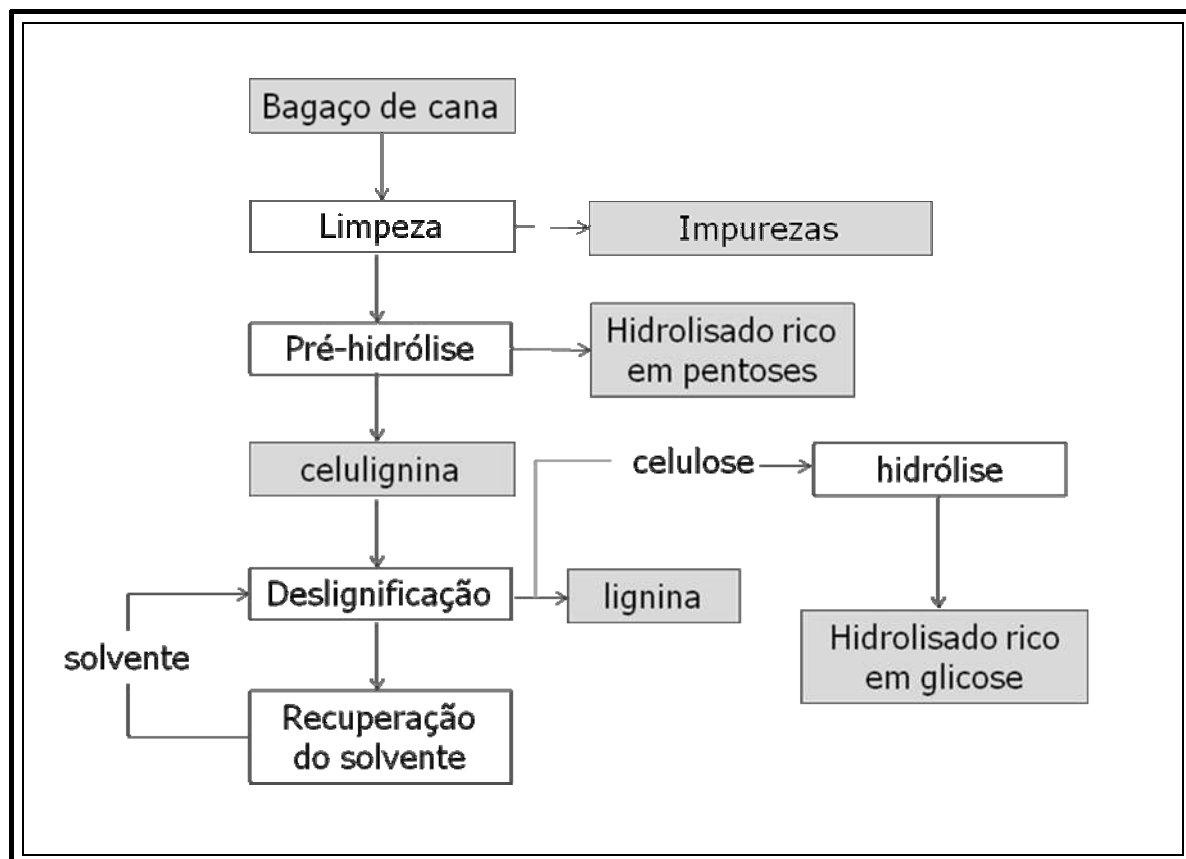


Figura 2.3.2.2: *Organosolv* inserido na produção do etanol de segunda geração

Fonte: Adaptado de Dias. *et al.* (2009)

A tabela 3.2 apresenta vantagens e desvantagens do processo organosolv em relação à hidrólise alcalina (método de deslignificação mais comum).

Tabela 3.2: Vantagens e desvantagens do processo organosolv em relação à hidrólise alcalina

Vantagens	Desvantagens
Condições brandas de operação	Liberação de possíveis inibidores das etapas seguintes
Possibilidade de reutilização ou separação do solvente	Recuperação do sólido rico em celulose dificultada
Processo menos oneroso	Fermentação do sólido gerado em tempos elevados

Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática da celulose ocorre sob condições brandas de pressão, temperatura e pH. A alta especificidade das enzimas por seu substrato elimina a chance de ocorrência de furfurais, que dificultam os processos subseqüentes. O consórcio enzimático utilizado na hidrólise da celulose é composto por três grupos de enzimas, classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico: Endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; Exoglucanases, que atuam na região externa da celulose; e β -glucosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis a glicose (LYND, 2002).

A figura 2.3.2.3 mostra um esquema de atuação do complexo celulásico.

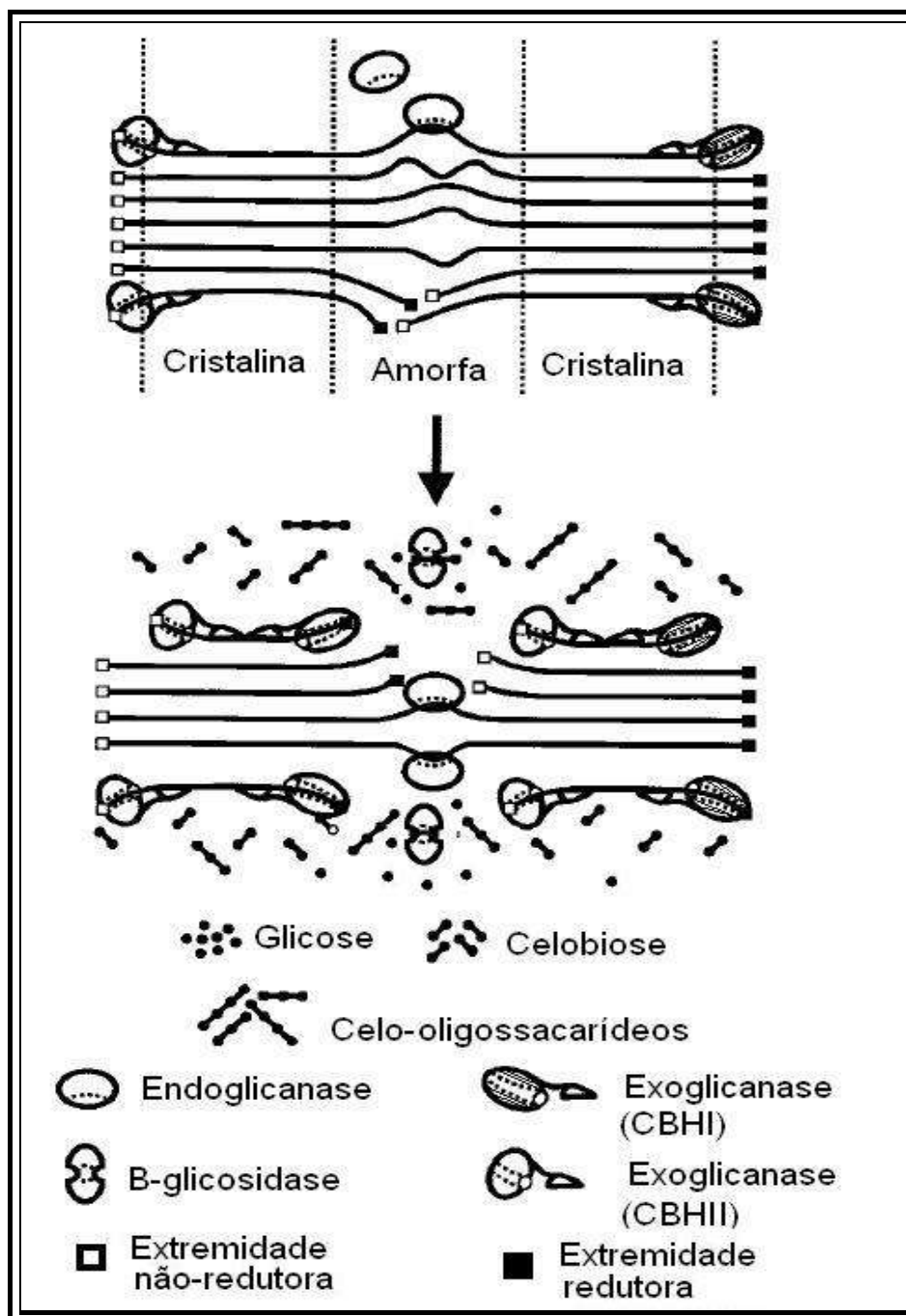


Figura 2.3.2.3: Representação esquemática da hidrólise de celulose pelo sistema celulolítico.

Fonte: Lynd *et al.*, 2002.

As endoglucanases são as enzimas que iniciam a hidrólise da fibra celulósica. Estas enzimas são responsáveis por clivar randomicamente as ligações internas das fibras que se encontram nas regiões amorfas da celulose, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização,

diminuindo o comprimento das mesmas e, conseqüentemente, gerando novas extremidades livres (LYND, 2002).

O grupo das exoglucanases é constituído por celobiohidrolases (CBHs) e glucanohidrolases (GHs). As celobiohidrolases agem de maneira progressiva em extremidades redutoras (CBHI) ou não-redutoras (CBHII) da celulose, com maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente, celobiose como produtos. As glucanohidrolases hidrolisam as fibras, liberando glicose diretamente dos terminais redutores.

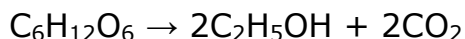
β -glucosidases representam um grupo de grande expressão dentre as enzimas hidrolíticas, atuam nos resíduos de celodextrina (oligossacarídeos com grau de polimerização menor que 7) e celobiose hidrolisando-os a glicose (LYND, 2002; AWAFO, 1997).

As enzimas do complexo celulolítico atacam o substrato de uma forma sinérgica, resultando em um aumento de eficiência pela ação de dois ou mais componentes de um sistema quando comparado a ação de cada um deles isoladamente. No caso das celulasas, esse sinergismo faz com que a velocidade de formação de produtos solúveis aumente significativamente quando comparado à velocidade de ação isolada das enzimas (LYND, 2002).

Fermentação

A fermentação alcoólica é conhecida desde os mais remotos tempos e era utilizada pelos povos antigos para produção de bebidas a partir de caldos açucarados obtidos pelo esmagamento de frutas (OLIVEIRA, 1960). Mesmo sendo conhecida há tanto tempo, a fermentação alcoólica aplicada à produção industrial de etanol propriamente dita iniciou-se a partir do século XIX (ALMEIDA, 1960).

Uma variedade de microrganismos, geralmente bactérias e fungos, fermentam carboidratos a etanol em condições livres de oxigênio (anaerobiose). A estequiometria básica desse processo é conhecida por:



A metodologia para a fermentação de açúcares de 6 carbonos (hexoses) já é conhecida a pelo menos 6 mil anos, quando Sumários, Babilônios e Egípcios começaram a descrever o processo de produção de cerveja a partir de grãos. Estes açúcares podem ser fermentados tanto por bactérias quanto por leveduras. Até a década de 1980, acreditava-se que somente bactérias tinham capacidade para fermentar os açúcares de 5 carbonos (pentoses). No entanto, nessa época, foram identificadas leveduras selvagens capazes de converter xilose em etanol (HAMELINCK, 2005).

O processo de fermentação dos açúcares produzidos pela hidrólise enzimática é dividido em duas etapas: fermentação de xilose e fermentação de glicose.

Os processos convencionais para produção de etanol utilizam a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como agente fermentador. Esse tipo de levedura é capaz de utilizar glicose como fonte de carbono, porém não é capaz de fermentar xilose. Leveduras como *Pichia stipitis* e *Pichia segobiensis* são capazes de fermentar xilose a etanol, com taxas de produção reduzidas quando comparadas às de fermentação alcoólica de glicose (PEREIRA Jr., 2008).

2.3.3 Tendências Tecnológicas

Existem, em nível de pesquisa, diferentes estratégias para a conversão de lignocelulósicos a etanol. Devido à presença de diferentes tipos de açúcares, faz-se necessário o emprego de enzimas em sinergia com microrganismos. Microrganismos recombinantes são de grande interesse na busca pela otimização do processo, através da redução de

etapas. Neste contexto, há quatro estratégias para a condução de processos.

Hidrólise e Fermentação em Separado (SHF)

É a concepção mais antiga e já consolidada para condução de processos de conversão de lignocelulósicos a etanol. Neste caso a hidrólise (química ou enzimática), etapa de pré-tratamento, ocorre num estágio separado da fermentação (PEREIRA Jr., 2008), como mostra a figura 2.3.3.1

A dificuldade deste processo reside no acúmulo de glicose e polissacarídeos, provenientes da hidrólise, que atuam como inibidores enzimáticos de algumas enzimas envolvidas, decorrendo numa hidrólise incompleta da celulose e também a geração de produtos tóxicos, no caso de hidrólise química. Uma vez terminada a hidrólise, o resíduo sólido é separado e o sobrenadante é empregado para fermentação por microrganismos (VÁSQUEZ, 2007).

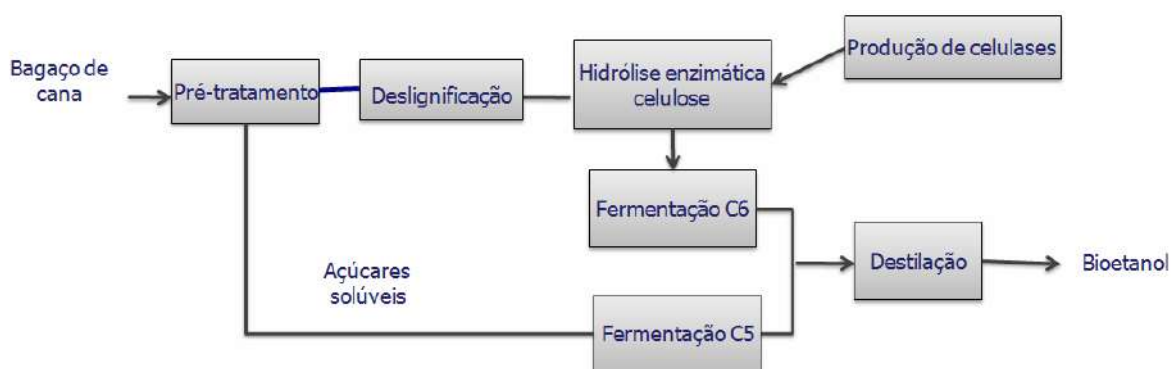


Figura 2.3.3.1. Diagrama de blocos representativo do processo SHF

Fonte: Wingren *et al.* (2003)

Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF)

Em processos SHF, a matéria-prima sofre pré-tratamento para liberação dos açúcares em sua forma monomérica, que posteriormente será fermentado por leveduras, porém, a alta concentração de glicose presente no meio de fermentação é responsável pelo fenômeno denominado repressão catabólica, onde as enzimas β -glucosidases são inibidas por seu produto (glicose). Este tipo de inibição enzimática pode ser evitado quando a glicose é disponibilizada em menores concentrações ao longo do processo (FERREIRA, 2008).

No processo SSF (*simultaneous saccharification and fermentation*) a sacarificação e a fermentação ocorrem em uma única etapa onde a hidrólise da macromolécula é realizada enzimaticamente e, à medida em que os açúcares são liberados as leveduras os consomem para a produção de etanol, desta forma, os açúcares são disponibilizados lentamente evitando a repressão catabólica, outras vantagens deste processo são a utilização de um único reator diminuindo o custo do processo e a proteção contra contaminações oferecida pela presença de etanol (FERREIRA, 2008). A esquematização deste processo está representada na figura 2.3.3.2.

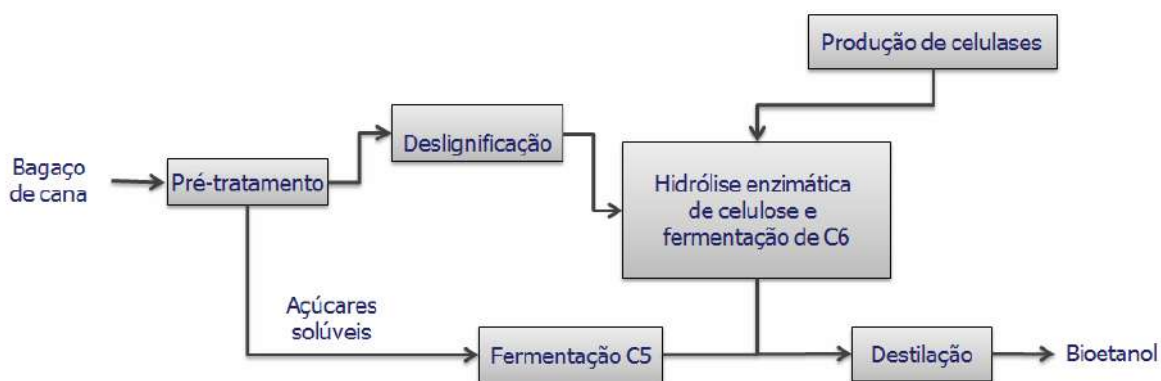


Figura 2.3.3.2. Diagrama de blocos representativo do processo SSF

Fonte: Wingren *et al.* (2003)

Sacarificação e Co-Fermentação Simultânea (SSCF)

Este processo envolve 3 etapas, das quais a hidrólise da fração hemicelulósica e a produção de celulases ocorrem separadamente, como mostra a figura 2.3.3.3. A hidrólise da celulose e a fermentação, tanto das pentoses quanto das hexoses, acontecem simultaneamente, num mesmo equipamento, sendo geralmente necessário o auxílio da biologia molecular para o desenvolvimento de microrganismos capazes de fermentar pentoses e hexoses (PEREIRA Jr., 2008).

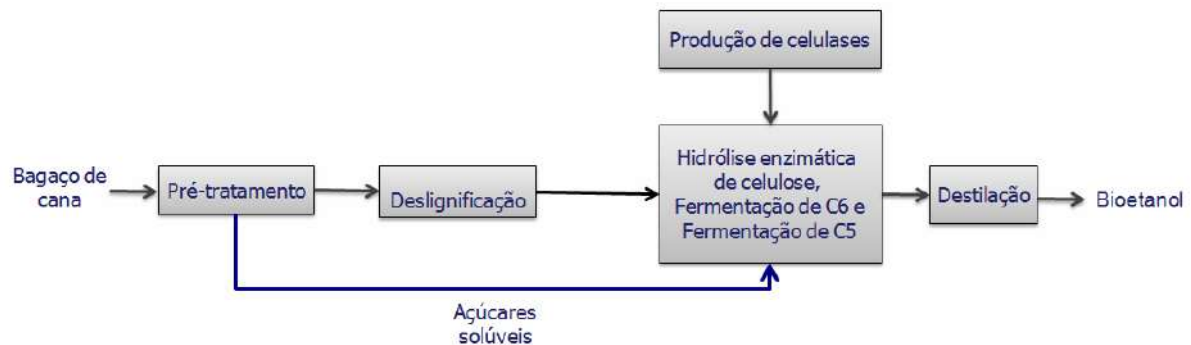


Figura 2.3.3.3: Diagrama de blocos representativo do processo SSCF

Fonte: Wingren *et al.* (2003)

Bioprocesso Consolidado (CBP)

É o processo de concepção mais complexo devido ao envolvimento das etapas de produção enzimática (celulases e hemicelulases), hidrólise de carboidratos a açúcares fermentáveis, fermentação de hexoses (glicose, manose e galactose) e fermentação de pentoses (xilose e arabinose) em um único equipamento (LYND, 2005). Para este processo é necessário recorrer às ferramentas modernas, como a engenharia genética, no intuito de se obter um microrganismo que consiga produzir

diversas enzimas que permitam a clivagem dos complexos hemicelulósico e celulósico, e alta habilidade fermentativa, tanto de pentoses quanto hexoses (PEREIRA Jr., 2008).

Trata-se de um processo no qual todas as etapas críticas para a obtenção de um produto são realizadas em um único equipamento, com um único microrganismo, como mostra a figura 2.3.3.4. É uma perspectiva a longo prazo, onde a engenharia genética terá um papel indispensável (PEREIRA Jr., 2008).

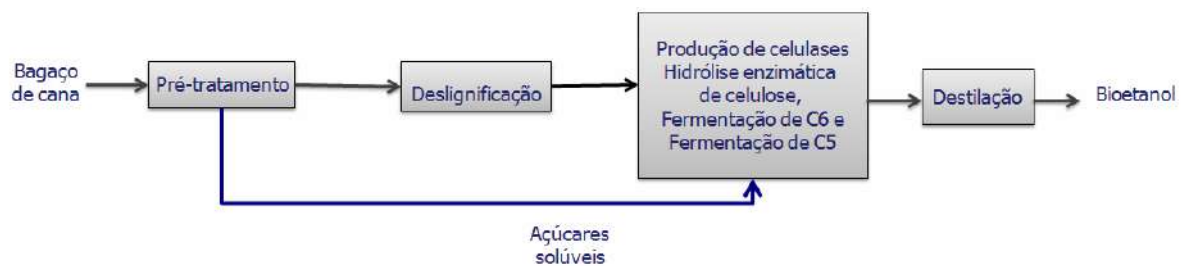


Figura 2.3.3.4. Fluxograma representativo do processo CBP

Fonte: Wingren *et al.* (2003)

Capítulo 3

Justificativa e Objetivos

3.1 Justificativa

É crescente a busca por substitutos para esses combustíveis e nada mais racional do que produzi-los com base em matéria orgânica renovável (biomassa), da qual, no passado distante, os combustíveis fósseis foram produzidos pela natureza.

A produção e o uso do etanol combustível no Brasil, desde 1975, constituem o mais importante programa de combustível comercial renovável implementado no mundo até hoje. Esse sucesso, hoje reconhecido, está aliado ao interesse crescente na substituição de derivados de petróleo, na redução de emissões de gases poluentes e na mitigação do efeito estufa (UNICA, 2007).

A produção do etanol brasileiro, a partir da fermentação do caldo de cana, gera grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos ricos em açúcares fermentáveis. O grande desafio que inicialmente era a disponibilização destes açúcares ao meio de fermentação, passou a ser a redução dos custos nos processos de produção do bioetanol.

O uso de métodos menos onerosos no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é um fator importante para a redução do custo do etanol de segunda geração.

O processo de deslignificação *organosolv* apresenta vantagens econômicas frente aos demais. Neste processo o solvente pode ser reutilizado ou recuperado, diminuindo os gastos com reagente; gasta-se menos energia visto que ocorre em condições mais brandas de temperatura e pressão, sem necessidade de adição de catalisadores.

Diante das vantagens apresentadas, a aplicação do processo *organosolv* na deslignificação de materiais lignocelulósicos é de grande interesse tecnológico.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo geral

Este Projeto Final de curso teve como objetivo investigar a aplicação do processo organosolv na deslignificação da celulignina de bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol de segunda geração.

3.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Testar metodologias *organosolvs* para deslignificação da celulignina de bagaço de cana-de-açúcar;
- ✓ Analisar a remoção de lignina durante o processo *organosolv*;
- ✓ Avaliar a geração de açúcares fermentáveis a partir do sólido obtido no *organosolv*;
- ✓ Avaliar a fermentabilidade do sólido gerado em *organosolv*;
- ✓ Avaliar a reutilização dos solventes de deslignificação.

Capítulo 4

Materiais e Métodos

4.1 Microrganismo

Todos os experimentos de fermentação alcoólica foram realizados utilizando a estirpe comercial de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann), empregada no processo de panificação.

4.2 Matéria-prima

O bagaço de cana-de-açúcar foi cedido pela usina “Costa Pinto” de Piracicaba, São Paulo, Brasil. O resíduo sólido, obtido no processo de extração da fração hemicelulósica (BETANCUR, 2005) e denominado celulignina, foi utilizado como matéria-prima lignocelulósica nesta pesquisa.

A celulignina é o subproduto da hidrólise ácida aplicada em condições brandas sobre o bagaço de cana para a extração dos açúcares da fração hemicelulósica (BETANCUR, 2005). A fração sólida resultante, celulignina, está composta basicamente por celulose e lignina residual do processo de hidrólise ácida.

4.3 Deslignificação *organosolv*

A deslignificação da celulignina foi realizada por processo *organosolv*, as condições experimentais estão apresentadas na tabela 4.3.1.

Tabela 4.3.1: condições experimentais dos processos de deslignificação *organosolv*.

	Solv. Orgânico (v/v/v)	Ácido m/m_{celulignina}	S:L (g/ml)	Tempo (h)	referência
AF	AC.acético/ác. Fórmico/água (60/30/10)	Ac. Clorídrico 0,1%	1:20	4	Xu et. al. (2006)
Ac	Acetona/água (50/50)	Ac. Clorídrico 0,1%	1:7	2	Araque et. al. (2007) *adaptado
Et	Etanol/água (60/40)	Ac. Clorídrico 0,1%	1:20	4	Xu et. al. (2006)

Os sistemas foram mantidos em ebulição ao longo do processo, em balões de fundo redondo acoplados a condensadores e aquecidos em manta (Figura 4.3.1).

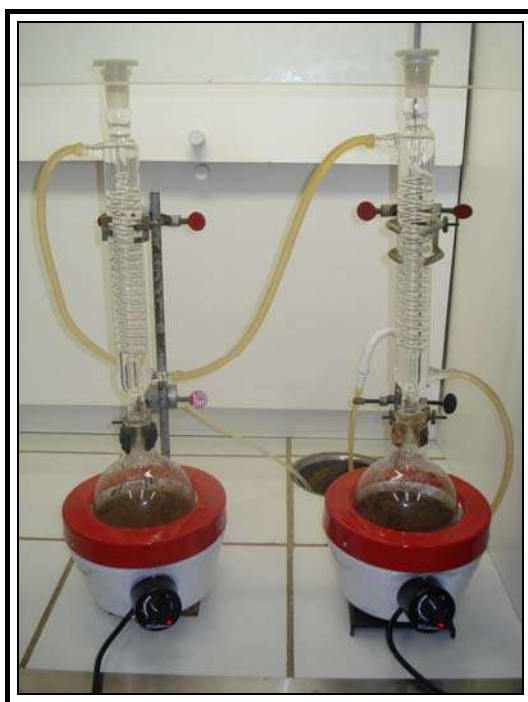


Figura 4.3.1: Sistema de deslignificação

Após o cozimento, o conteúdo do balão foi filtrado a vácuo. A fração líquida foi submetida a análise espectrofotométrica, a fim de analisar qualitativamente a presença de lignina solúvel. A fração sólida (celulignina tratada) foi submetida à lavagem a quente, seguida de lavagem em água corrente e posteriormente o sólido ficou submerso em água destilada por aproximadamente 18h e, por fim foi filtrada e seca em estufa a 50°C.

4.4 Hidrólise enzimática

As hidrólises enzimáticas foram realizadas a temperatura de 47°C e agitação orbital de 250 rpm, sendo o meio tamponado com citrato de sódio pH 5,0, carga enzimática de 25 FPU/g de material celulósico com uma relação sólido:líquido de 1:10 e utilizando o consórcio enzimático comercial Multifect (*Genencor International*) (Vasquez, 2007).

4.5 SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation)

A etapa de fermentação e hidrólise simultânea foi realizada com o uso de fermentômetros. Após a etapa de pré-hidrólise (seção 4.4) os sistemas foram incubados a 37°C, 250 rpm e concentração celular de 4 g/L. Os valores de concentração de etanol correspondem a valores de etanol equivalente, que são estimados através de conversão estequiométrica entre gás carbônico (CO₂) desprendido e etanol produzido. O acompanhamento do desprendimento de CO₂ foi possível devido a utilização de fermentômetro, dispositivo que impede a entrada de ar no sistema, permitindo desta forma, o acompanhamento da perda de massa.

4.6 Métodos analíticos

As quantificações de glicose e etanol final foram realizadas utilizando o sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da *Waters® Corporation* contendo o sistema de bombeamento modelo 510 (*Waters*), injetor *Rheodyne*, detector de índice de refração modelo 2487 (*Waters*) e integrador HP 3390A (*Hewlett Packard*). Foi utilizada a coluna de troca iônica Sugar SC1011 (*Shodex®*), mais adequada para os analitos em questão. Como fase móvel foi utilizada água “MiliQ” a uma vazão de 0,6 mL/min. sob pressão de 500 psi. O volume de amostra injetada foi de 5 µL. As temperaturas do forno e do detector foram de 75°C e 40°C, respectivamente.

O tratamento das amostras foi realizado de acordo com o esquema apresentado na figura 4.6.1.

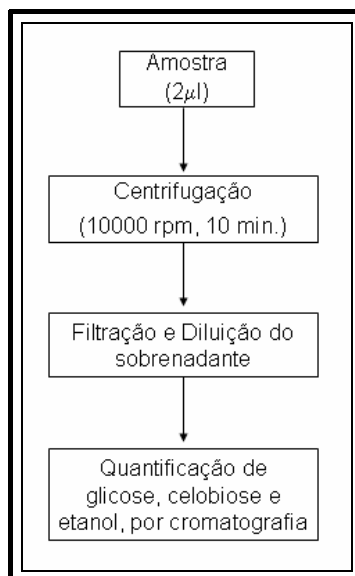


Figura 4.6.1: Representação esquemática do tratamento das amostras

4.7 Influência do pH na deslignificação

Para avaliar a influência do pH na deslignificação, quantidades iguais de celulignina foram submetidas a 6 diferentes processos

organosolv, em duas faixas de pH. A tabela 4.7.1 apresenta as condições de cada *organosolv*.

Em seguida, a celulignina tratada foi submetida à hidrólise enzimática seguindo as condições descritas na seção 4.4 durante 48h. Foram retiradas alíquotas após 24h e 48h de hidrólise para quantificação de açúcares.

O mesmo procedimento foi realizado com celulignina sem prévio tratamento, denominada "branco".

Tabela 4.7.1: condições experimentais

	Solvente orgânico (v/v)	Ácido	S:L (g/ml)	Tempo (h)	pH
1	Ac.Acético/Ac.Fórmico/Água (60/30/10)	HCl 0,1% p/p _{celulignina}	1:20	4	NA*
2	Ac.Acético/Ac.Fórmico/Água (60/30/10)	HCl 0,1% p/p _{celulignina}	1:20	4	2,0
3	Etanol/Água (60/40)	HCl 0,1% p/p _{celulignina}	1:20	4	2,0
4	Etanol/Água (60/40)	HCl 0,1% p/p _{celulignina}	1:20	4	5,0
5	Acetona/Água (50/50)	HCl 0,1% p/p _{celulignina}	1:7	2	1,2
6	Acetona/Água (50/50)	HCl 0,1% p/p _{celulignina}	1:7	2	2,0

*NA: não ajustado

Além do pH proposto na literatura, foram testados pH's um pouco mais elevados, a fim de verificar que tipo de influência esta variável tem sobre o processo de deslignificação. Os pHs foram ajustados com solução 1M de NaOH.

4.8 Avaliação da fermentabilidade da celulignina deslignificada por processo *organosolv*

A deslignificação do material lignocelulósico é imprescindível no processo de produção do etanol de segunda geração visto que a lignina presente neste material dificulta o acesso das enzimas celulolíticas à celulose. Porém, a remoção da lignina não garante o sucesso das etapas seguintes, hidrólise e fermentação, por este motivo deve-se avaliar a fermentabilidade da celulignina gerada.

A fermentabilidade deste material foi avaliada em dois processos SSF denominados SSF1 e SSF2, nos quais utilizou-se os sólidos tratados em *organosolv* com as condições apresentadas na seção 4.3.

A diferença entre os processos de fermentação e sacarificação simultâneas foi o tempo de pré-hidrólise enzimática. Em SSF1, a pré-hidrólise durou 13,5h enquanto a pré-hidrólise de SSF2 durou 24h, o processo seguiu as condições experimentais apresentadas na seção 4.5. A pré-hidrólise foi realizada de acordo com a descrição de hidrólise apresentada na seção 4.4.

4.9 Avaliação da reutilização dos solventes aplicados ao processo *organosolv*

A reutilização dos solventes é fundamental para a viabilidade do processo *organosolv*, além de representar uma das maiores vantagens deste método de deslignificação.

Para avaliar a eficiência da deslignificação realizada com solvente reutilizado, utilizou-se 13,5h de pré-hidrólise enzimática (SSF1), em que os sólidos empregados foram deslignificados pelo líquido residual de uma deslignificação convencional (seção 4.3), mantendo a relação sólido:líquido.

Capítulo 5

Resultados e discussões

5.1. Deslignificação organosolv

A deslignificação da celulignina de bagaço de cana-de-açúcar seguiu metodologia descrita na seção 4.3. Após a deslignificação da celulignina por processo *organosolv* a fração de lignina é solubilizada, conferindo uma cor escura ao líquido residual (Figura 5.1.1).



Figura 5.1.1: Fração líquida após deslignificação *organosolv*

Devido a sua natureza aromática, a lignina absorve dentro da região do ultravioleta (UV). O espectro típico para lignina apresenta picos ao redor de 250 nm, 230 nm e 280 nm; é composto por bandas de absorção de unidades fenilpropano, que constituem o polímero de lignina. O pico de 280 nm é, freqüentemente, utilizado para avaliar a concentração de lignina em solução, utilizando uma solução de α -conidendrina como padrão de comparação (BRITO, 1999).

Na figura 5.1.2. estão apresentados os espectros de absorvância das frações líquidas resultantes dos processos *organosolv*. Pode-se observar que os maiores valores de absorvância na faixa de 230nm a 280nm coincidem com os líquidos de coloração mais escura, indicando maior remoção de lignina quando a mistura ác.acético/ác.fórmico/água foi empregada na deslignificação da celulignina.

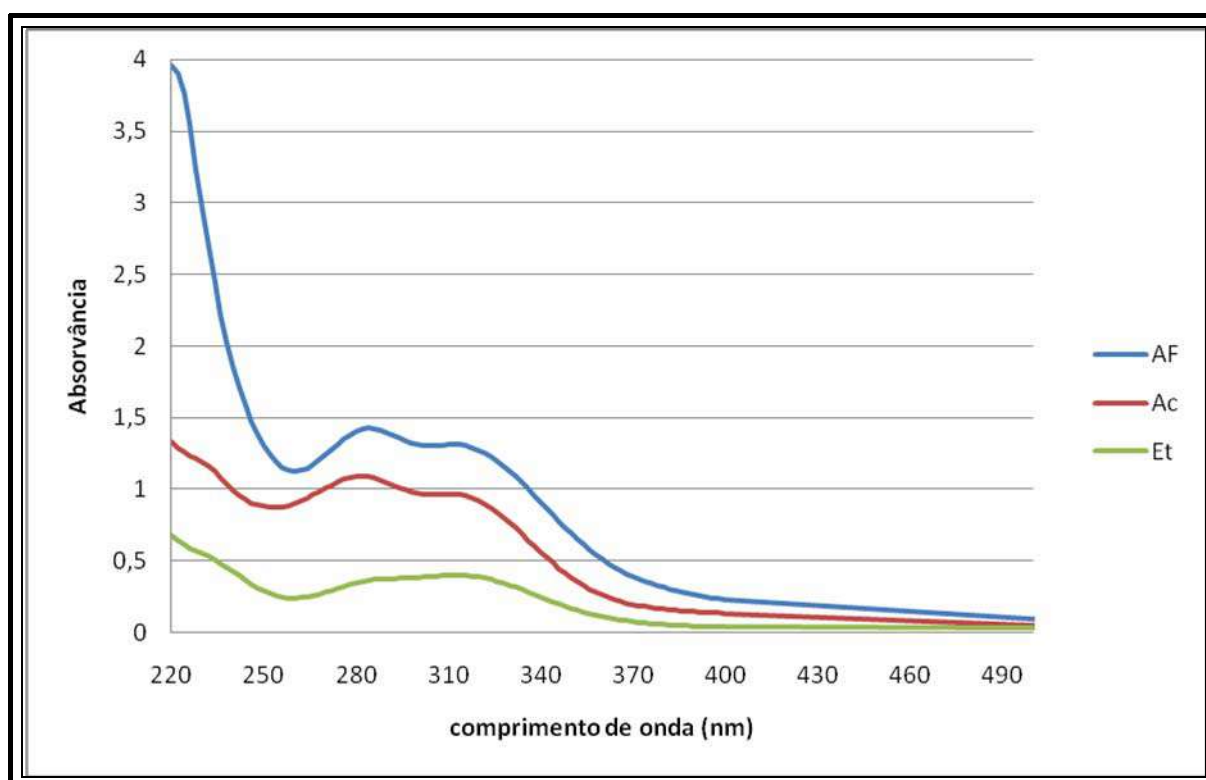


Figura 5.1.2: Espectros de absorvância das frações líquidas resultantes dos diferentes *organosolvs*. AF: deslignificação com ácido acético e ácido fórmico; AC: deslignificação com acetona; Et: deslignificação com etanol.

A análise das frações sólidas obtidas ao final do processo de deslignificação permitiu a visualização da alteração na coloração do sólido deslignificado, tornando-se levemente mais claro após os processos *organosolv* (Figura 5.1.3).

Melhoramentos na atuação das enzimas celulásicas foram observados quando a biomassa lignocelulósica foi submetida a tratamentos prévios, sejam eles químicos ou termopressurizados, nos quais são retiradas as frações interferentes – lignina – no processo de hidrólise enzimática (ERIKSSON, 2002).

A deslignificação de materiais lignocelulósicos por processo *organosolv* é amplamente citada na literatura (LIGERO *et. al.*, 2005; XU *et. al.*, 2006; ARAQUE *et. al.*, 2007; SUN *et. al.*, 2004; LIGERO *et. al.*, 2007; OLIET *et. al.*, 2002). Neste processo, solventes orgânicos e ácidos são utilizados para remover a lignina. Primeiramente o solvente promove a impregnação do tecido vegetal, em seguida ocorrem o ataque nucleofílico da água e reações solvolíticas que facilitam a solubilização da lignina (FERREIRA, 2001).

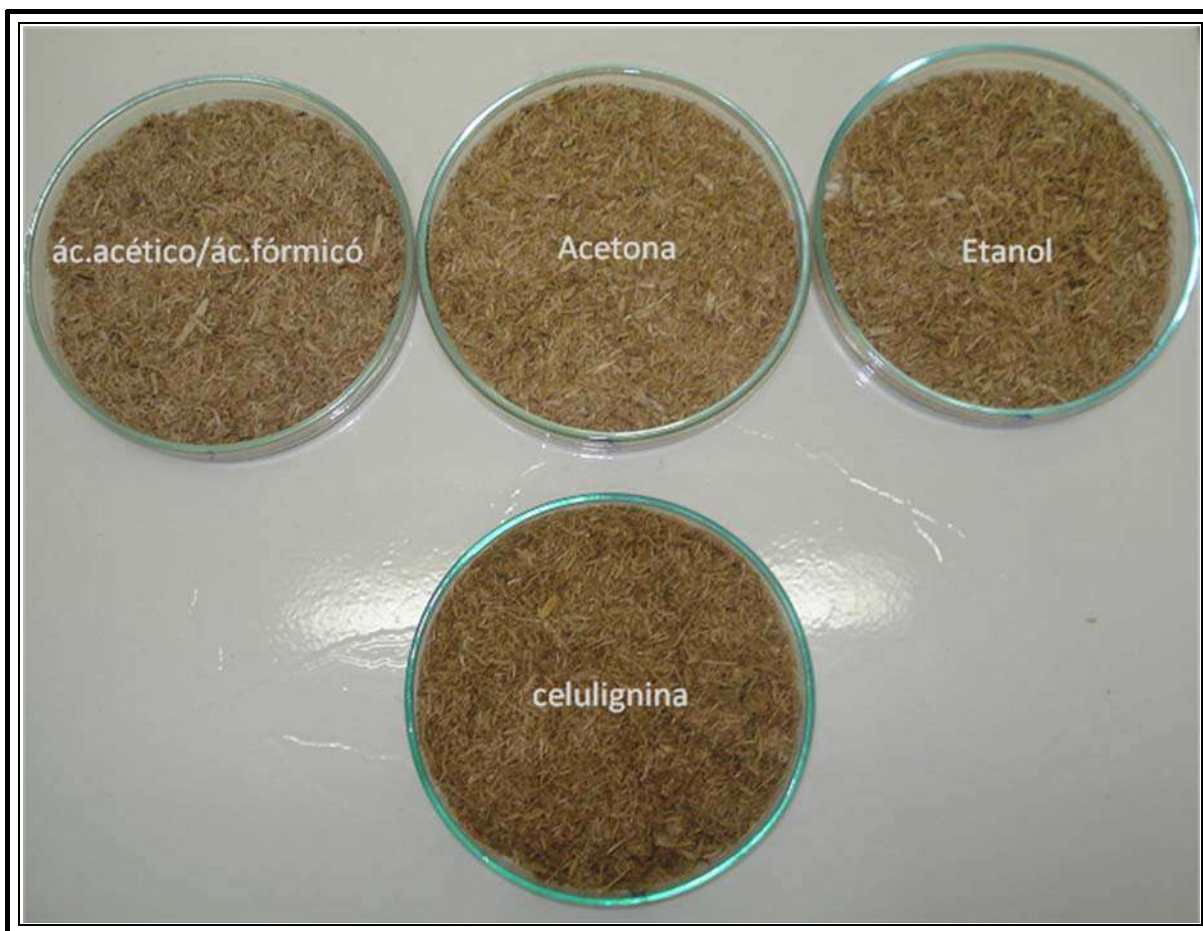


Figura 5.1.3: fração sólida após deslignificação *organosolv* – celulignina pré-tratada - comparada com celulignina sem tratamento de deslignificação.

As figuras 5.1.4, 5.1.5 e 5.1.6, apresentadas a seguir, mostram o líquido e o sólido residuais após a deslignificação. Observa-se que quanto mais escuro é o líquido gerado, mais claro é o sólido obtido, evidenciando a extração da lignina da parte sólida e apontando o sistema ác.acético/ác.fórmico como o mais promissor na deslignificação da celulignina.



Figura 5.1.4: Frações líquida e sólida após deslignificação com ác.acético/ác.fórmico



Figura 5.1.5: Frações líquida e sólida após deslignificação com acetona

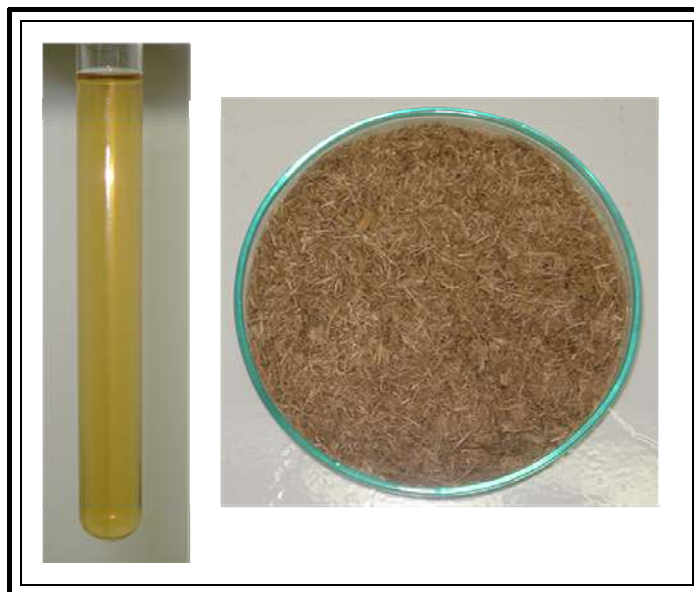


Figura 5.1.6: Frações líquida e sólida após deslignificação com etanol

Com esta análise qualitativa a mistura aquosa de ácido acético e ácido fórmico forneceu melhor desempenho na deslignificação dentre as analisadas.

5.2 Influência do pH na deslignificação

O pH de uma solução pode ser um fator que influencia a solubilidade de uma dada substância num solvente. Sendo assim, foram avaliados diferentes valores de pH para a deslignificação da celulignina com a finalidade de analisar a influencia desta variável sobre a solubilidade da lignina nos solventes estudados, seguindo metodologia descrita na seção 4.7.

A figura 5.2.1 apresenta a concentração de glicose obtida após 24h e 48h de hidrólise da celulignina gerada nos diferentes processos *organosolvs*. Os experimentos foram realizados em duplicata e apresentaram desvio padrão médio de 10%. Pode-se observar que a quantidade de glicose gerada após a pré-hidrólise de celuligninas deslignificadas (1, 2, 3, 5 e 6) foi superior à quantidade de glicose obtida ao final da hidrólise da celulignina não deslignificada (B).

Os experimentos 1, 2 e 5 produziram os valores mais altos em concentração de glicose: 18,2 g/L; 18,9 g/L e 18,4 g/L, respectivamente. E em todos os casos a concentração de glicose teve aumento significativo de 24h para 48h de hidrólise enzimática.

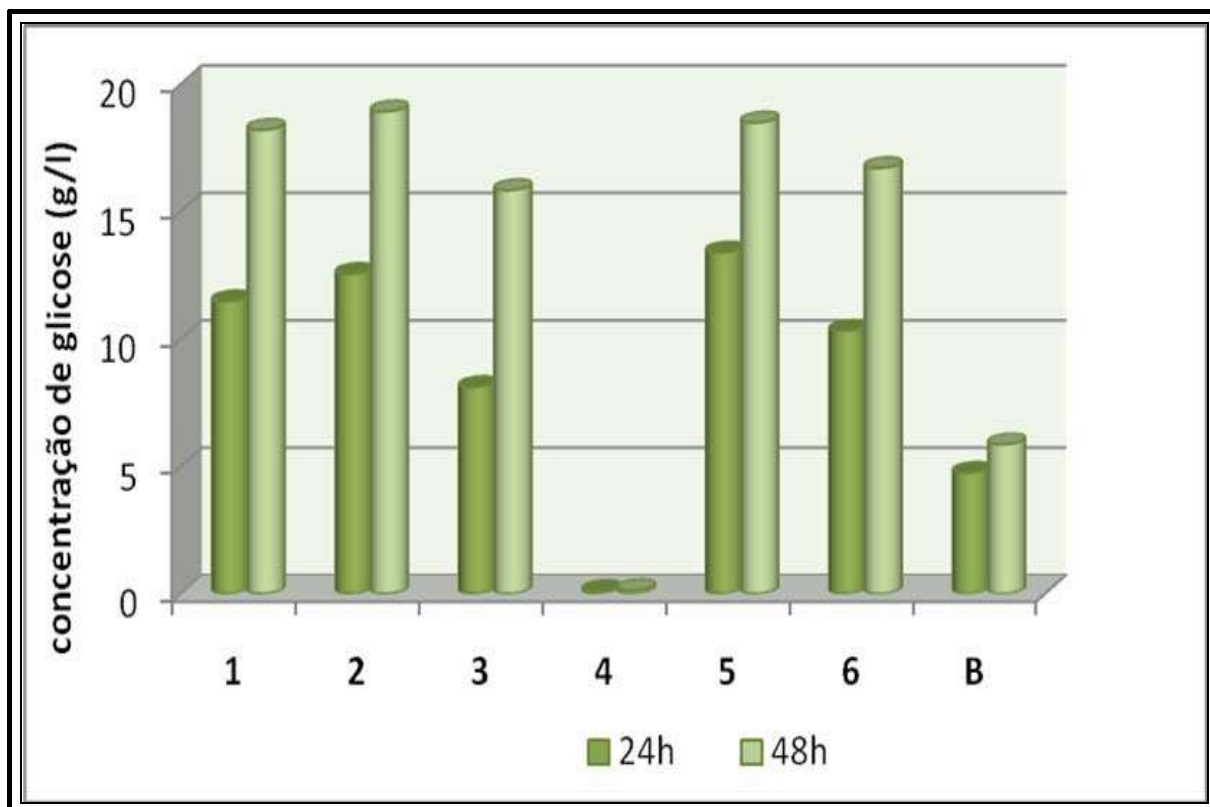


Figura 5.2.1: Concentração de glicose após 24h e 48h de hidrólise enzimática de celulignina pré-tratada por diferentes processos *organosolv*: 1 – ác.acético/ác.fórmico/água pH extremamente ácido; 2 - ác.acético/ác.fórmico/água pH 2,0. 3 – etanol pH 2,0; 4 – etanol pH 5,0; 5 – acetona pH 1,2; 6 – acetona pH 2,0. B – celulignina não deslignificada

Novamente o sistema de deslignificação da celulignina com a mistura ác.acético/ác.fórmico/água foi o que apresentou os resultados mais significativos, corroborando com a evidência de que as condições que produziram os líquidos mais escuros, promoveram maior eficiência de remoção de lignina.

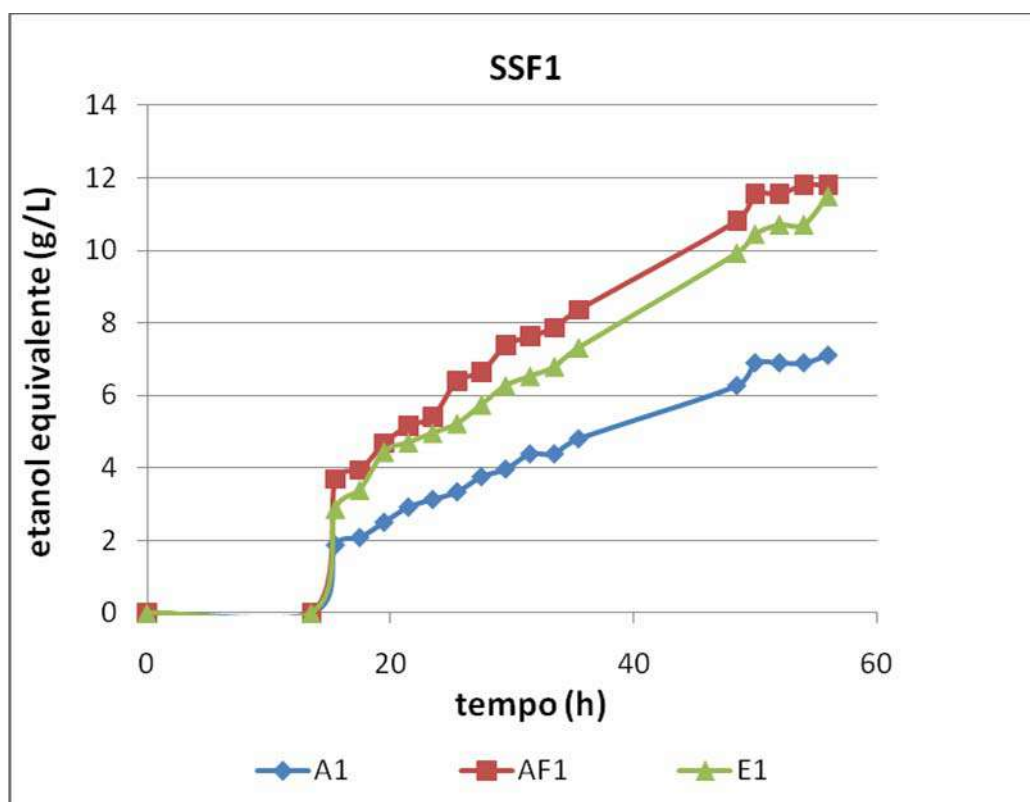
Utilizou-se a concentração de glicose com parâmetro de resposta para avaliar eficiência de deslignificação. Como a quantidade de glicose disponível ao final da hidrólise foi superior quando se utilizou celulignina

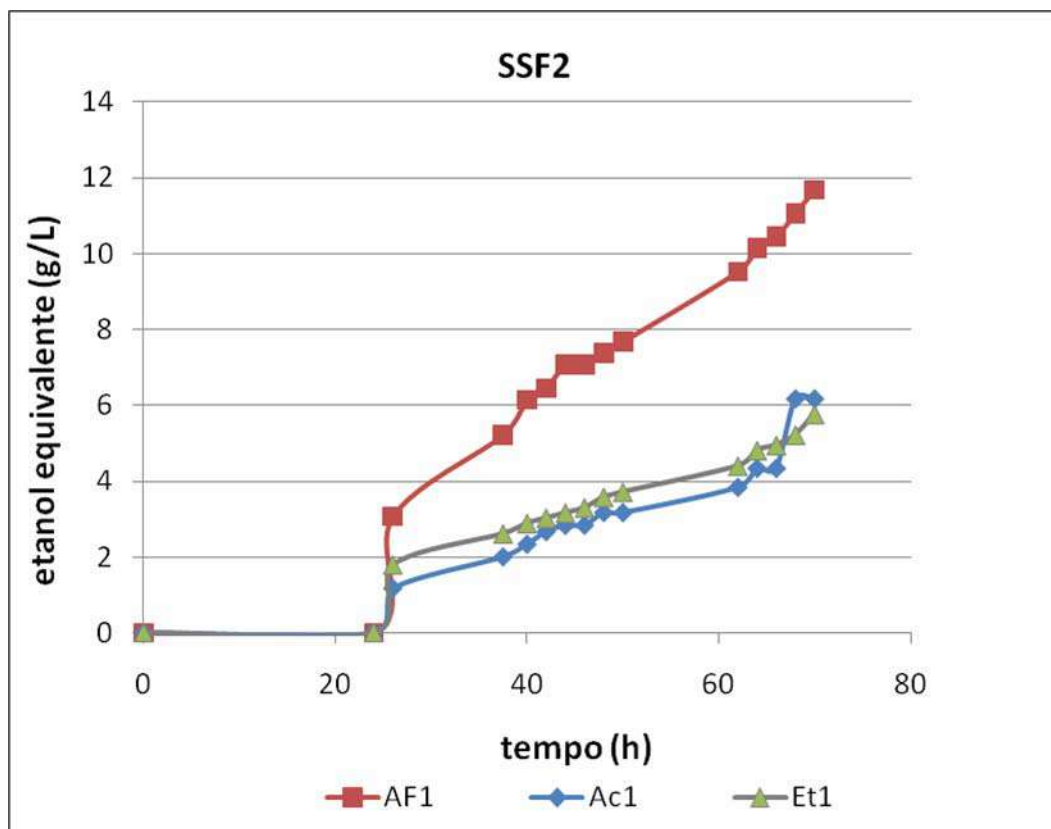
pré-tratada pelo processo *organosolv*, pode-se concluir que a deslignificação foi eficiente, exceto no processo 4, quando solução de etanol com pH 5,0 foi aplicada à deslignificação.

O pH não apresentou grande influência na deslignificação, com exceção dos experimentos envolvendo etanol. Desta forma, para os experimentos seguintes não foi realizado o ajuste de pH; deslignificações com ácido acético e ácido fórmico foram realizadas em pH extremamente ácido; e deslignificações com acetona e etanol em pH em torno de 2,0.

5.3 Avaliação da fermentabilidade da celulignina deslignificada por processo *organosolv*

A figura 5.3.1 apresenta os perfis cinéticos de produção de etanol a partir dos sólidos gerados nos diferentes *organosolv*.





Sólidos designificados com AF1: ác.acético/ác.fórmico/água (60/30/10,v/v/v); Et1: etanol 60%; Ac1: acetona 50%

Figura 5.3.1: Perfis cinéticos de produção de etanol

O tempo de pré-hidrólise foi diferente para cada SSF com o intuito de avaliar a influência da hidrólise sobre o processo de sacarificação e fermentação simultâneas. Segundo Vásquez (2007), no processo SSF existe um momento no qual o fator limitante na produção de etanol deixa de ser a levedura (no que concerne ao consumo de glicose) e passa a ser a taxa de liberação de glicose, por parte das enzimas celulolíticas. Desta forma, a produção de etanol é igualada, independente da concentração de levedura ou do tempo inicial de hidrólise enzimática.

Em SSF2 o tempo de pré-hidrólise é maior, logo a quantidade de açúcares gerada inicialmente também o é e desta forma a produção de etanol nas primeiras horas é mais acentuada. Ao longo dos processos a produção de etanol se iguala, chegando a aproximadamente 12 g/L após 44h de processo SSF (descontando-se o tempo de pré-hidrólise), corroborando com Vásquez (2007).

O processo *organosolv* é amplamente citado na literatura, principalmente para a substituição dos processos clássicos de polpação utilizados pela indústria de papel e celulose, porém estudos sobre a aplicação deste processo na produção do etanol de segunda geração são pouco conhecidos. No primeiro caso o foco de estudo é a remoção da maior quantidade de lignina possível, no caso do etanol de segunda geração a pesquisa é voltada para a adequação da fibra de celulose às etapas seguintes (hidrólise enzimática e fermentação).

A principal preocupação quando se realiza a deslignificação do material lignocelulósico para produção de bioetanol é a fermentabilidade do produto final da deslignificação. A presença de solvente orgânico residual na celulignina pode ter inibido a hidrólise através da repressão enzimática, diminuindo sua taxa.

Alguns autores comprovam a eficiência do processo *organosolv* em remover lignina (OLIET *et. al.*, 2002; LIGERO *et.al.*, 2005; LIGERO *et. al.*, 2007; XU *et. al.*, 2006), sem a preocupação com a fermentabilidade do sólido obtido. Neste experimento avaliou-se a fermentabilidade da celulignina resultante do processo de deslignificação *organosolv*, para produção de etanol de segunda geração, através da metodologia apresentada na seção 4.8.

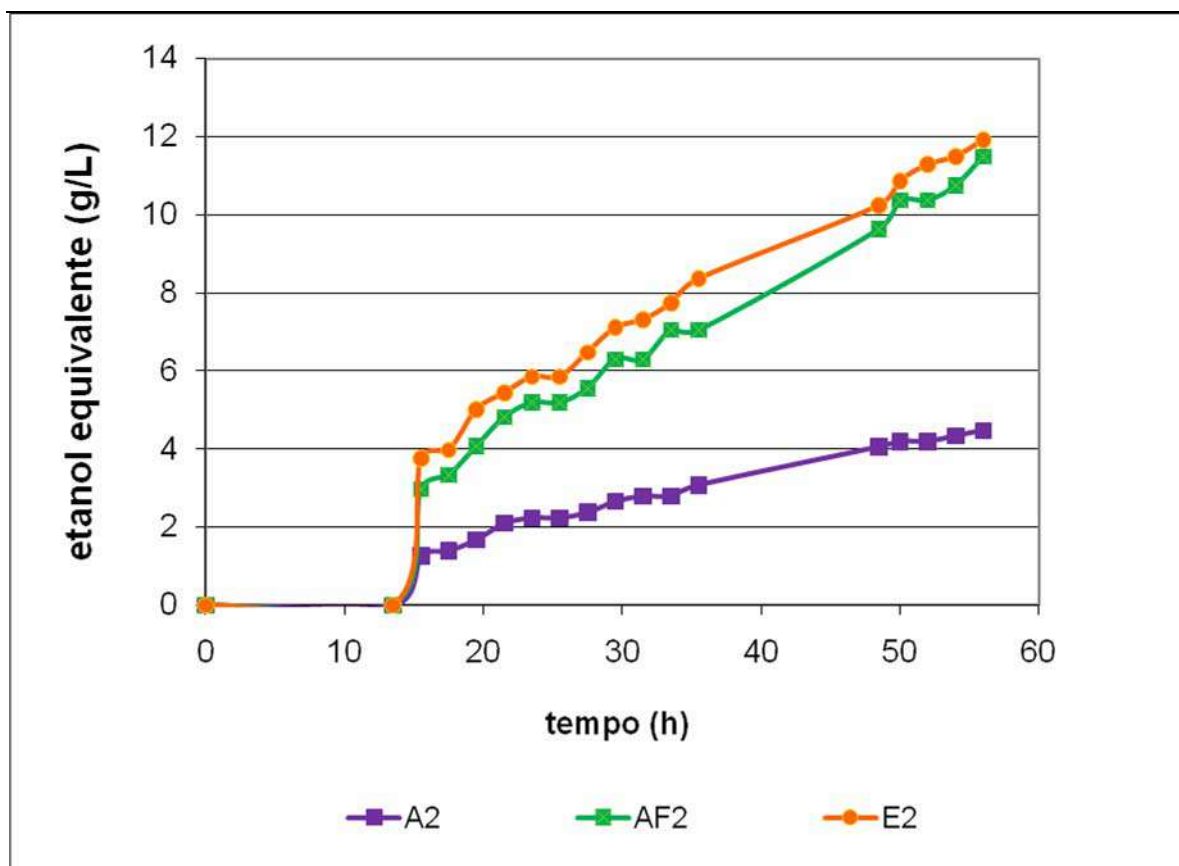
Diante dos resultados observa-se que a celulignina tratada por *organosolv* é fermentável a etanol, constituindo um processo promissor na produção de bioetanol de cana-de-açúcar.

5.4 Avaliação da reutilização dos solventes aplicados ao processo *organosolv*

Uma das vantagens do *organosolv* frente a outros métodos de deslignificação é a possibilidade de reutilização do solvente. Desta forma foi verificada a possibilidade de reutilização dos solventes seguindo metodologia descrita na seção 4.9.

De acordo com os resultados obtidos na seção 5.3, selecionou-se as condições de SSF1 para avaliar a fermentabilidade das celuligninas deslignificadas por solvente reutilizado.

Analisado as cinéticas apresentadas na figura 5.4.1, percebe-se a viabilidade da reutilização dos solventes, visto que o Perfis cinéticos é similar àquela obtida por celuligninas deslignificadas por organosolv convencional (sem reutilização de solvente). Foi obtida a concentração de 12g/L de etanol após 44h de SSF, quando os solventes de deslignificação foram ácido acético e ácido fórmico ou etanol.

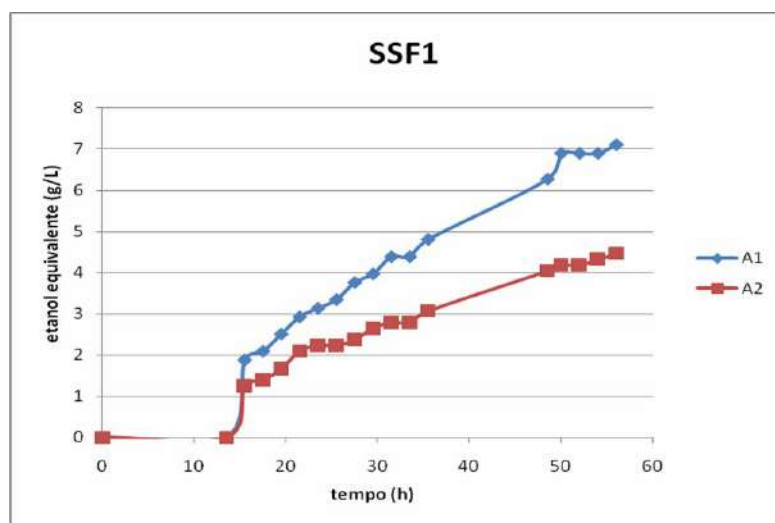
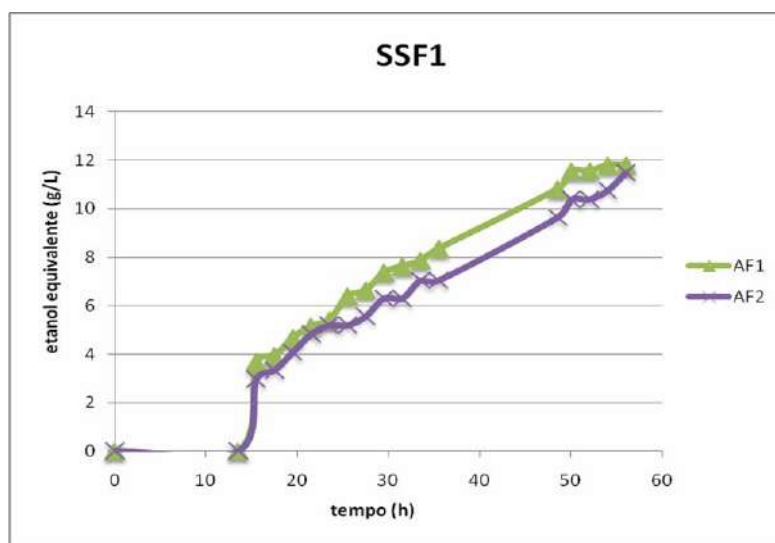


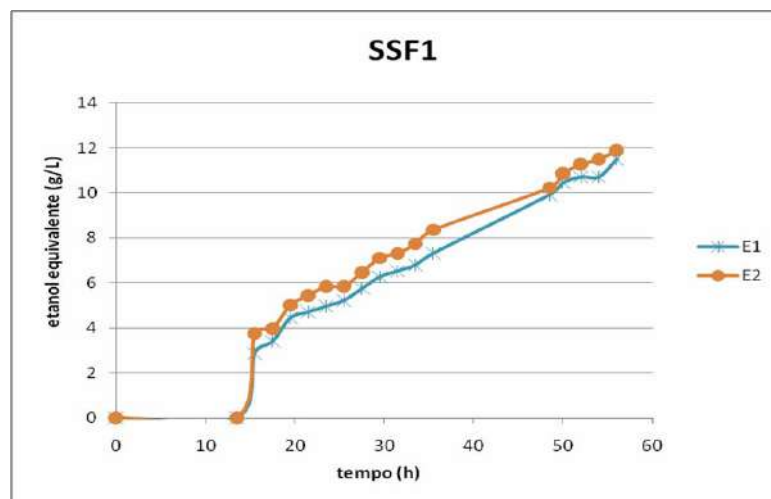
Sólidos deslignificados com AF2: ác.acético/ác.fórmico/água reutilizado; E2: etanol reutilizado; A2: acetona reutilizada

Figura 5.4.1: Perfis cinéticos Cinéticas de produção de etanol

A figura 5.4.2 apresenta a comparação dos perfis cinéticos de produção de etanol em SSF, em que AF1, A1 e E1 foram realizadas com

sólidos provenientes de uma deslignificação convencional (condições descritas na seção 4.3); AF2, A2, e E2 foram realizadas com sólidos deslignificados com o solvente recuperado na deslignificação anterior.





Sólidos deslignificados com AF1: ác.acético/ác.fórmico/água (60/30/10,v/v/v); Et1: etanol 60%; Ac1: acetona 50%

Figura 5.4.2: Perfis cinéticos da produção de etanol para SSF1

Tanto na utilização de ácido acético/ ácido-fórmico quanto etanol como agentes de deslignificação obteve-se concentrações aproximadas de etanol (12g/L) após SSF, independente da reutilização ou não do solvente. Quando acetona foi utilizada como agente de deslignificação a reutilização gerou uma redução de 37% na produção de etanol após SSF (Figura 5.4.2).

Capítulo 6

Conclusões

1. Os processos *organosolv* aplicados à deslignificação da celulignina foram eficientes, aumentando em cerca de 3,5 vezes a concentração de glicose após hidrólise enzimática da celulignina tratada, quando comparada à hidrólise da celulignina não tratada.
2. O pH não influenciou a solubilização da lignina nos solventes estudados de maneira significativa.
3. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi capaz de fermentar o hidrolisado proveniente da hidrólise enzimática da celulignina tratada gerando 12 g/L de etanol após 44h de SSF. Cabe ressaltar que tanto o processo de deslignificação quanto o processo SSF não foram otimizados.
4. Os solventes de deslignificação puderam ser reutilizados em uma nova deslignificação de forma eficiente, produzindo cerca de 12 g/L de etanol após 44h de SSF. Quando acetona foi utilizada como agente de deslignificação a reutilização gerou uma redução de 37% na produção de etanol após SSF.
5. O sistema de deslignificação utilizando ácido Acético e ácido Fórmico foi o mais eficiente dentre os avaliados. Além de gerar o líquido residual mais escuro (evidenciando a maior remoção de celulignina), este sistema foi o que gerou o sólido mais promissor na produção de etanol de segunda geração quando *organosolv* é o método de deslignificação.

Capítulo 7

Referências

ALMEIDA, J. R. (1960) **Processo de recuperação de levedura ou processo Melle-Boinott**. Anais da Semana de Fermentação Alcoólica, Piracicaba, p. 254-262.

ARAQUE. E.; PARRA. C.; FREER. J.; CONTRERAS. D.; RODRÍGUEZ. J.; MENDONÇA. R.; BAEZA. J. (2007) **Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol**. Enzyme and Microbial Technology.

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.

BETANCUR, G.J.V. (2005) **Avanços em Biotecnologia de Hemicelulose para Produção de Etanol por *Pichia stipitis***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Brasil.

Bioetanol de cana-de-açúcar – energia para o desenvolvimento sustentável. 1ª edição. Rio de Janeiro, novembro de 2008. Disponível em www.bioetanoldecana.org.

BNDES. **Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias**. Disponível em <http://bndes.gov.br>; acesso em (22.11.08)

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.

CGEE. (2005) **Estudo sobre as possibilidades e impactos da produção de grandes quantidades de etanol visando à substituição parcial de gasolina no mundo**. Relatório final, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos CGEE-Nipe/Unicamp.

CHUM; JOHNSOON, D.K & BLACK, S. (1988). **Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplars: 1. enzyme hydrolysis of cellulosic residues**. Biotechnology Bioeng., v. 31, p. 643–649.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. (2005) **Xylanases, xilanase families and extremophilic xilanases**. FEMS Microbiology Reviews. V. 29, p. 3-23.

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.

DIAS, M. O. S., *et al.*, (2009) **Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process.** Chem Eng Res Des

ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J. & TJERNELD, F. (2002) **Mechanism of Surfactant Effect in Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose.** Enzyme and Microbial Technology, v. 31, p. 353-364.

ESTEGHLALIAN; HASHIMOTO, A.G.; FENSKE, J.J. & PENNER, M.H. (1997). **Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass.** Bioresource Technology, v. 59, p. 129-136.

FENGEL, D; WENEGER, G. (1989) **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions.** Berlin: Walter de Gruyter, 613p.

FERREIRA, L. H. (2001) **Deslignificação Organossolve/Dióxido de Carbono de Eucalyptus urograndis em condições sub e supercríticas.** Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

FERREIRA, V.; FABER, M. O.; SOUZA, L. B. R.; MORAES, L. M. P.; PEREIRA Jr., N. (2008) **Hidrólise Enzimática e Fermentação de Diferentes Materiais Celulósicos para Produção de Etanol Utilizando *Saccharomyces cerevisiae* Recombinante.** XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ).

HAMELINK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G. & FAAIJ, A. P. C. (2005) **Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long term.** Biomass & Bioenergy, v. 28, n. 4, p. 384 - 410.

LAMONICA, H. M. (2005) **Geração de energia elétrica a partir da biomassa de cana; In: SEMINÁRIO BIOELETRICIDADE.** Rio de Janeiro. Anais eletrônicos. Rio de Janeiro: BNDES. Palestra. Disponível em:
http://www.inee.org.br/downloads/eventos/Geracao_EE_Biomassa_Cana_Lamonica_BNDES_2005.pdf. Acesso: fev./2006.

LEE, C. K.; KUO, C. H. (2008) **Enhancement of enzymatic saccharification of cellulose by cellulose dissolution pretreatments.** Carbohydrate Polymers . v.77, p. 41-46.

LEE, H.; SOPHER, C.; YAN, K. (1997) **Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities on mixed sugars in *C. guilliermondii***. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. v. 66, p. 375-379.

LIGERO. P.; VEGA. A.; BAO. M. (2005) **Acetosolv delignification of *Miscanthus sinensis* bark Influence of process variables**. Industrial Crops and Products. V. 21, p. 235-240

LIGERO. P.; VILLAYERDE. J. J.; VEGA. A.; BAO. M. (2007) **Acetosolv delignification of depithed cardoon (*Cynara cardunculus*) stalks**. Industrial Crops and Products. V. 25, p. 294-300

LYND, L. R.; ZYL, W. H.; McBRIDE, J. E.; LASER, M. (2005) **Consolidated Bioprocessing of Cellulosic Biomass: an update**. *Current Opinion in Biotechnology*. V.16, p.577-583.

LYND, L.R.; WEIMER, P.L.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. (2002) **Microbial Celulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology**. *Microbiology Molecular Biolology Reviews*. v. 66, n.3, p.506-577.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) (2007). **Balanço Nacional da Cana-de-Açúcar e Agroenergia**. Disponível em www.agricultura.gov.br. Acesso em agosto/2008.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) (2008). **Anuário estatístico da agroenergia**. Disponível em www.agricultura.gov.br. Acesso em março/2009.

MAST, T. (2005) **Let's Stop Procrastinating on Alternatives to Oil**. Energy. Outono, p. 45-47.

McMILLAN, J. (2004) **Biotechnological Routes to Biomass Conversion**. Disponível em: www.nrel.gov/docs/gen/fy04/36831g.pdf. Acesso: fev./2006.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LANDISCH, M. (2005) **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass**. Bioresource Technology, v. 96, p.673-686.

MUSSATTO, 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.

OLIET. M.; GARCÍA. J.; RODRÍGUEZ. F.; GILARRRANZ. M. A. (2002) **Solvent effects in autocatalyzed alcohol–water pulping:**

Comparative study between ethanol and methanol as delignifying agents. Chemical Engineering Journal. V. 87, p. 157–162

OLIVEIRA, E. R. (1960) **Histórico da fermentação alcoólica.** Anais da Semana de Fermentação Alcoólica, Piracicaba, p. 196-205.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M. A. P. G.; ANNA, L. M. M. S. (2008) **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery.** Series on biotechnology, v.2, 1a ed.

SARKANEN, K.V. (1980). **Acid-catalyzed delignification of lignocellulosics in organic solvents.** Prog. Biomass Convers., v. 2, p. 127–144.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. (2003) **Microbial hemicellulases.** Current Opinion in Microbiology. v.6, p. 219-228.

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/dbedt/info/energy/transportation/ethanol/studies/ethanol94.pdf. (acesso em outubro/2008)

SIMÕES, J. (2005) **Orçamento do Centro de Tecnologia Canavieira deve triplicar até 2010; maior linha de pesquisa é com variedades de cana.** NOTÍCIAS DA INOVAÇÃO Centro de Tecnologia Canavieira <http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/news-ctc1.php>

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

SUN, J.X.; SUN, X.F.; ZHAO, H. & SUN R.C. (2004) **Isolation and Characterization of Cellulose from Sugarcane Bagasse.** Polymer Degradation and Stability, v. 84, p. 331-339.

SUN, Y. & 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) (2007). **Produção e uso do etanol combustível no Brasil.** Disponível em: <http://www.portalunica.com.br>. Acesso em março/2009.

UNICA (União de Agroindústria Canavieira de São Paulo) (2008). **Balanço nacional da cana-de-açúcar e agroenergia.** Disponível em [HTTP://www.unica.com.br](http://www.unica.com.br). Acesso em março/2009.

VÁSQUEZ, M. P., **Desenvolvimento de Processo de Hidrólise Enzimática e Fermentação Simultâneas para a Produção de Etanol a Partir de Bagaço de Cana-de-Açúcar.** Tese Doutorado (Doutorado

em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Escola de Química. (2007)

WINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. (2003) **Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood – a comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks**. Biotechnology Program. v. 19, n. 4, p. 1109-1117.

XU; SUN, J. X.; SUN. R. C.; FOWLER. P.; BAIRD. M. S. (2006) **Comparative study of organosolv lignins from wheat straw**. Industrial Crops and Products, V. 23, p. 180–193.