



Produção de Etanol de Bagaço de Cana-de-Açúcar: Otimização da Deslignificação da *Celulignina* Visando o Processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas

Felipe Rodrigues Alves dos Santos
Juliana Nascimento Cardozo da Silva

Projeto Final de Curso

Orientadores:

Nei Pereira Jr, *PhD*
Mariana Peñuela Vásquez, *MSc*

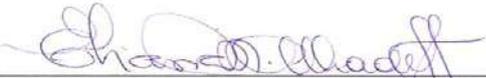
Setembro de 2007

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE BAGAÇO DE CANA-
DE-AÇÚCAR: OTIMIZAÇÃO DA
DESLIGNIFICAÇÃO DA *CELULIGNINA* VISANDO
O PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO E
FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS**

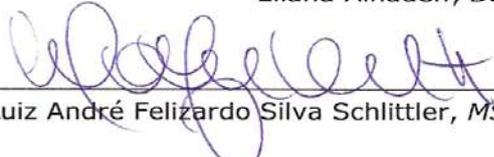
Felipe Rodrigues Alves dos Santos
Juliana Nascimento Cardozo da Silva

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

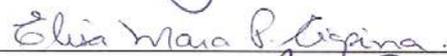
Aprovado por:



Eliana Alhadef, DSc

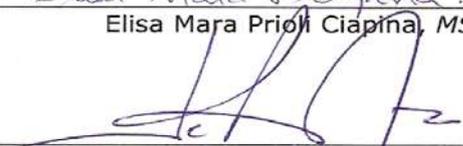


Luiz André Felizardo Silva Schlittler, MSc

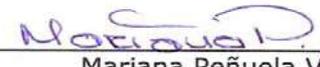


Elisa Mara Prioli Ciapina, MSc

Orientado por:



Nei Pereira Jr, PhD



Mariana Peñuela Vásquez, MSc

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
Setembro de 2007

Ficha Cartográfica

Santos, Felipe Rodrigues Alves.
Silva, Juliana Nascimento Cardozo.

Produção de Etanol de Bagaço de Cana-de-Açúcar: Otimização da Deslignificação da *Celulignina* Visando o Processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas / Felipe Rodrigues Alves dos Santos, Juliana Nascimento Cardozo da Silva. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2007.

(xii,64p.; il)

Projeto Final de Curso – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2007.

Orientadores:

Nei Pereira Jr. e Mariana Peñuela Vásquez.

1. Etanol.
2. Deslignificação.
3. *Celulignina*.
4. Monografia (Graduação - UFRJ/EQ).
5. Nei Pereira Jr. e Mariana Peñuela Vásquez.

I. Título.

*Dedico este trabalho
A minha mãe por acreditar e permitir que o meu sonho fosse
realizado,
A minha maravilhosa família pelo apoio,
A minha orientadora Mariana por tudo que aprendi ao seu lado e
Ao amigo Luizão pelo apoio, incentivo e companheirismo.*

Juliana Nascimento Cardozo da Silva

*Dedico este trabalho
Aos meus avós pelo incentivo,
Ao meu irmão pelo companheirismo,
A minha mãe pelo amor incondicional,
Ao meu pai que confiou no potencial do primogênito,
Em suma,
A minha maravilhosa família que sempre esteve ao meu lado.*

Felipe Rodrigues Alves dos Santos

*“É impossível fazer as mesmas coisas todos os dias
e querer obter resultados diferentes.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela benção e oportunidade de terminar o curso de graduação com louvor;

Ao Prof. Nei Pereira Jr. e a Mariana Peñuela Vásquez, pela orientação e auxílio no desenvolvimento deste projeto final de curso, além disso, principalmente, pela confiança e amizade;

Ao grande amigo Luizão pelo apoio e momentos de descontração;

A família que sempre deu, em todas as situações, total apoio e amor incondicional;

A todos os colegas do Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos, pela ajuda na solução de problemas e pelo companheirismo que tornaram o laboratório um lugar agradável;

Aos amigos pela compreensão e cumplicidade na vida acadêmica e pessoal, auxiliando nos momentos difíceis e compartilhando as alegrias; e

Aos funcionários da Secretaria de Graduação da Escola de Química, por facilitar a realização de toda a burocracia envolvida no decorrer de toda a graduação.

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

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR:
OTIMIZAÇÃO DA DESLIGNIFICAÇÃO DA *CELULIGNINA*
VISANDO O PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO
SIMULTÂNEAS**

Felipe Rodrigues Alves dos Santos
Juliana Nascimento Cardozo da Silva

Setembro, 2007

Orientadores: Nei Pereira Jr, *PhD*
Mariana Peñuela Vasquez, *MSc*

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo lignocelulósico da indústria sucroalcooleira que contém aproximadamente 38,1% de celulose, 28,4% de hemicelulose e 19% de lignina. A celulose é hidrolisada pelas enzimas celulolíticas compostas por três tipos de enzimas: Endoglucanases, Exoglucanases e β -glucosidases. O processo SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) é um sistema em estado semi-sólido no qual se promove um sinergismo: as enzimas liberam a glicose contida nos polímeros de celulose e as leveduras são responsáveis pelo consumo da glicose, eliminando o efeito inibitório da hexose sobre as enzimas, e produzindo etanol. Para adequar o substrato para esta etapa do processo de produção de etanol a partir de bagaço de cana é realizada uma deslignificação, a qual eleva os custos de produção do álcool. Este trabalho visou diminuir o emprego de hidróxido de sódio na etapa de deslignificação. Realizou-se uma otimização do pré-tratamento de deslignificação, obtendo como resultado uma diminuição do NaOH empregado de 4% para 1% (m/v) e da relação sólido:líquido de 1:20 para 1:15. Assim conseguiu-se uma redução de 75% no hidróxido de sódio e de 25% na quantidade de água utilizada.

ÍNDICE GERAL

	Página
Capítulo 1	
APRESENTAÇÃO DO TEMA DO PROJETO FINAL DE CURSO	1
1.1. INTRODUÇÃO	1
1.2. JUSTIFICATIVA	4
Capítulo 2	
OBJETIVO DO PROJETO FINAL DE CURSO	6
2.1. OBJETIVO GERAL	6
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	6
Capítulo 3	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL	8
3.2. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	18
3.2.1. Hemicelulose	18
3.2.2. Celulose	19
3.2.3. Lignina	26
3.3. UTILIZAÇÃO DO ETANOL COMO COMBUSTÍVEL	27
3.3.1. Potência do Etanol como Combustível	28
3.3.2. Etanol como aditivo a gasolina	28
3.3.3. Vantagens da Utilização do Etanol	29
3.4. BALANÇO MATERIAL DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL	30
3.5. AVALIAÇÃO ECONÔMICA	32

Capítulo 4	
MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. MICRORGANISMO	34
4.2. MATÉRIA-PRIMA	34
4.3. PROCESSOS DE DESLIGNIFICAÇÃO	35
4.4. CONSÓRCIO ENZIMÁTICO	35
4.5. PRÉ-HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS	35
4.6. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESLIGNIFICAÇÃO	36
4.7. VALIDAÇÃO DA CONDIÇÃO ÓTIMA EM BIORREATOR	38
4.8. METODOLOGIA ANALÍTICA	38
4.8.1. Amostras	38
4.8.2. Quantificação dos Metabólitos	38
4.8.3. Quantificação da Atividade Enzimática	40
Capítulo 5	
RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. CINÉTICA EM FERMENTÔMETROS	41
5.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5.3. VALIDAÇÃO DA CONDIÇÃO ÓTIMA	50
5.4. AVALIAÇÃO ECONÔMICA	51
Capítulo 6	
CONCLUSÕES	54
Capítulo 7	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 3.1: Diagrama de blocos da produção de bagaço em usinas e destilarias (Adaptado de Schlittler, 2006).	10
Figura 3.2: Evolução da produção de bagaço no Brasil (UNICA, 2005).	11
Figura 3.3: Diagrama de blocos do processo SSF (Vásquez, 2007).	12
Figura 3.4: Esquema do processo SSF (Vásquez, 2007).	14
Figura 3.5: Fluxograma do bioprocesso (Schlittler, 2006).	16
Figura 3.6: Estrutura típica da hemicelulose (Mussatto, 2002).	19
Figura 3.7: Fibras de celulose na parede das células vegetais (Moor <i>et al.</i> , 1998).	20
Figura 3.8: Estrutura simplificada da celulose (Pereira Jr., 1991).	21
Figura 5.1: Fermentômetro usado nas fermentações.	42
Figura 5.2: Perfil cinético da fermentação da <i>celulignina</i> pré-tratada com 4% de NaOH.	42
Figura 5.3: Perfil cinético da fermentação da <i>celulignina</i> pré-tratada com 2,5% de NaOH.	43
Figura 5.4: Perfil cinético da fermentação da <i>celulignina</i> pré-tratada com 1% de NaOH.	44
Figura 5.5: Gráfico de Pareto de Efeitos Padrão para os pré-tratamentos do planejamento experimental.	47
Figura 5.6: Superfície de resposta correspondente à função <i>desirability</i> .	49
Figura 5.7: Perfis cinéticos da validação em biorreator.	50

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 3.1: Descrição das siglas do bioprocesso da Figura 3.5.	17
Tabela 3.2: Propriedades de algumas fontes celulósicas (Zhang & Lynd, 2004).	22
Tabela 3.3: Diferenças entre hemicelulose e celulose.	26
Tabela 3.4: Quantidade de insumos utilizados no processo (Schlittler, 2006).	31
Tabela 4.1: Intervalos utilizados para construir o planejamento experimental (3^2) para o processo de deslignificação.	37
Tabela 4.2: Matriz do Planejamento Experimental para a Minimização da % de NaOH da deslignificação.	37
Tabela 4.3: Condições operacionais do cromatógrafo.	39
Tabela 5.1: Concentração final de etanol.	45
Tabela 5.2: Análise de variância (ANOVA) dos fatores do pré-tratamento na produção de etanol ($R^2 = 0,82$).	46
Tabela 5.3: Comparação entre os custos total e por litro de etanol para Schlittler (2006) e este trabalho.	52
Tabela 5.4: Comparação entre os preços finais do etanol para os diferentes cenários.	52

CAPÍTULO 1

1. APRESENTAÇÃO DO TEMA DO PROJETO FINAL DE CURSO

1.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico tem nos levado à inevitável depleção das reservas de petróleo e a um ambiente com preocupantes níveis de poluição. Ambos os fenômenos têm se tornado altamente importantes no mundo, afetando tanto questões ambientais e econômicas, como as que envolvem a segurança mundial e as políticas de produção e comercialização de petróleo e seus derivados.

Diante dessa problemática tem surgido um crescente interesse por fontes alternativas de energia, destacando-se os empreendimentos realizados pelo Brasil e pelos Estados Unidos no desenvolvimento de projetos para a produção do bioetanol, com base em resíduos agroindustriais oriundos da cana-de-açúcar e do milho, respectivamente. Atrelado a esse interesse pelo etanol como

combustível encontram-se: a indústria automobilística, com vendas crescentes de veículos movidos a álcool e os do tipo "flex fuel" (utiliza qualquer mistura etano-gasolina); os governos, com diversas regulamentações que aumentam o teor de álcool na gasolina; e a indústria de biotecnologia, com enzimas e microorganismos cada vez mais eficientes. A sinergia existente entre esses setores vem aumentando, acentuadamente, a produção, o consumo, a pesquisa e o desenvolvimento na área de biocombustíveis.

Os atuais projetos de investigação relacionados com a produção de etanol objetivam o desenvolvimento de processos que permitam o aproveitamento eficiente de resíduos lignocelulósicos, matéria-prima abundante e de baixo custo, em processos que favoreçam a produtividade igual ou superior àquelas obtidas pelos processos existentes.

Na atualidade, especificamente no Brasil, um dos maiores produtores de açúcar e etanol, gera anualmente, como sub-produto da moagem de cana-de-açúcar, aproximadamente 96 milhões de toneladas de bagaço de cana, das quais, segundo dados de Pereira (2007), entre 60 e 90% são utilizados para alimentação de caldeiras e, entre 10 e 40% não possuem destinação apropriada. Além disso, indústrias especializadas no desenvolvimento de equipamentos para a produção de etanol, asseguram que, com a implementação de estratégias de integração energética e o uso de caldeiras de última geração, o excedente do bagaço poderia atingir a marca de 78%.

O bagaço de cana constitui-se, aproximadamente, 38,1% de celulose, 28,4% de hemicelulose, 18,4% de lignina e o restante de cinzas, resinas e proteínas (Ryu & Lee, 1992), apresentando-se como um dos materiais lignocelulósicos com maior potencial para a

produção de etanol e outros produtos de interesse, dentro do conceito denominado de "*biomass refinery*" ou "*bio-refinaria*". Este conceito baseia-se na separação seletiva de frações do material lignocelulósico de acordo com suas características químicas e/ou dos produtos a serem obtidos, sendo necessário desenvolver processos eficazes para disponibilizar os monômeros (açúcares) e para a transformação destes monômeros em processos de fermentação com altas taxas de produção (Pereira Jr., 2006).

Direcionados por esse conceito, pode-se afirmar que a hemicelulose e a celulose representam uma fonte potencial de açúcares como a xilose e a glicose, respectivamente, os quais funcionam como blocos de construção para a obtenção do etanol.

O processo responsável pela produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar, o qual é um dos objetivos de estudo deste trabalho, denomina-se "Simultaneous Saccharification and Fermentation" (SSF). Segundo a análise econômica deste processo realizada por Schlittler (2006), apresentou uma etapa crítica, que aumenta os custos do etanol produzido. Esta etapa, a deslignificação ou pré-tratamento básico, visa à desorganização e a remoção da lignina, aumentando a acessibilidade das enzimas celulolíticas à matriz celulósica.

1.2. JUSTIFICATIVA

A última crise mundial do petróleo (2007) teve como base a grande demanda energética e a oferta insuficiente, provocando o aumento dos preços do petróleo acima de 80 dólares por barril. Esta crise mundial associada à crescente procura por novas fontes energéticas e o aumento da conscientização ambiental, motivou a busca por novos combustíveis renováveis.

O Brasil produz grandes quantidades de bagaço de cana que são gerados no setor sucroalcooleiro. Parte deste bagaço é empregado como combustível em caldeiras, porém permanece um excedente que pode ser aproveitado na produção biotecnológica de etanol (Lynd, 1996).

Na busca por combustíveis renováveis, pesquisas com o intuito de produzir etanol a partir do bagaço de cana estão se intensificando. A matriz polissacarídica do bagaço de cana são as matérias-primas do processo: a hemicelulose é constituída majoritariamente por xilose, que é o principal carboidrato da fermentação, e a celulose, polímero composto unicamente por unidades de glicose. Ambos os açúcares podem ser empregados como substrato para a produção de etanol.

O bioprocessamento de produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar, desenvolvido no Laboratório de Bioprocessos (UFRJ), possui duas etapas críticas que encarecem e tornam o preço final do etanol não competitivo dentro do mercado (Schlittler, 2006).

A primeira etapa refere-se ao longo tempo empregado no pré-tratamento ácido termo-pressurizado do bagaço de cana para a hidrólise da hemicelulose, que se apresentou como uma etapa de alto gasto energético ao ser comparado com os dados da literatura. A segunda etapa, o pré-tratamento básico ou processo de deslignificação, emprega grandes quantidades de hidróxido de sódio, com o propósito de remover a lignina e tornar a celulose mais acessível ao ataque das enzimas.

CAPÍTULO 2

2. OBJETIVO DO PROJETO FINAL DE CURSO

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo é minimizar a quantidade de hidróxido de sódio empregada no pré-tratamento básico da celulignina para tornar o preço final do etanol competitivo no mercado, visando à grande procura por biocombustíveis energeticamente sustentáveis, economicamente viáveis e ambientalmente corretos para a substituição dos combustíveis derivados do petróleo.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Realizar um planejamento experimental fatorial completo de dois fatores em três níveis (3^2) com quatro repetições do ponto central para determinar a quantidade ótima de hidróxido de sódio empregada no pré-tratamento, sem impactar nas taxas de produção de etanol;

-
- Fazer a análise estatística dos resultados obtidos no planejamento experimental;
 - Validar as condições preditas pelo modelo gerado na análise estatística;
 - Avaliar o impacto da redução da quantidade de hidróxido de sódio no preço final do etanol com o intuito de torná-lo competitivo frente aos outros combustíveis do mercado.

CAPÍTULO 3

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL

O emprego de biomassa residuais (agrícolas e agroindustriais) de natureza lignocelulósica está ganhando importância como matéria-prima para a produção de substâncias de alto valor agregado para as indústrias químicas.

O bagaço é um resíduo de natureza lignocelulósica fibrosa, remanescente da moagem dos colmos da cana-de-açúcar. É obtido na saída do último moinho das usinas e destilarias, e constitui um conjunto de partículas de diferentes tamanhos, o qual depende fundamentalmente do número de moagens realizadas e do tamanho dos equipamentos. Segundo Lamonica (2005), o bagaço compõe, em média, 28% do peso da cana, ou seja, a cada 1 tonelada de cana (colmos) processada, gera-se 280 kg de bagaço com 50% de umidade.

O bagaço de cana-de-açúcar é composto por hemicelulose, celulose e lignina, principalmente. Porém, também podem ser encontrados taninos, ácidos graxos, fenóis, resinas, compostos nitrogenados, sais minerais, cálcio, potássio e magnésio em menores quantidades na matriz lignocelulósica (Shleser, 1994; Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996, Neureiter *et al.*, 2002).

A Figura 3.1 representa, de forma simplificada, um fluxograma de processo típico de produção de açúcar e álcool. Em vermelho está ressaltada a rota seguida pelo bagaço. Parte deste é desviada para a co-geração de energia, e o restante é armazenado como excedente.

Inicialmente o uso fundamental do bagaço foi como combustível para caldeiras, na geração de calor para a produção de vapor originando a energia mecânica e elétrica utilizada no processo. Esta finalidade se mantém até hoje, o que foi de grande importância para o desenvolvimento do parque sucroalcooleiro nacional, já que este confere auto-sustentabilidade energética para as usinas e destilarias.

Segundo Schlittler (2006), a energia gerada através da queima do bagaço é competitiva, pois se estima que é possível produzir 1 GJ de energia ao custo de U\$1. Mesmo assim, existe um excedente de bagaço que constitui entre 10 e 15% do total de bagaço produzido nas usinas.

Nas últimas décadas houve um aumento significativo na produção de bagaço de cana-de-açúcar, como mostrados na figura 3.2, devido ao crescimento na demanda de etanol combustível (Fairbanks, 2003; Pandey *et al.*, 2000a). Com a substituição do bagaço por palha, nas caldeiras, ao uso de caldeiras mais eficientes, junto à integração energética das usinas e destilarias, a disponibilidade do bagaço de

cana vem aumentando, tornando ainda maior o excedente deste material.

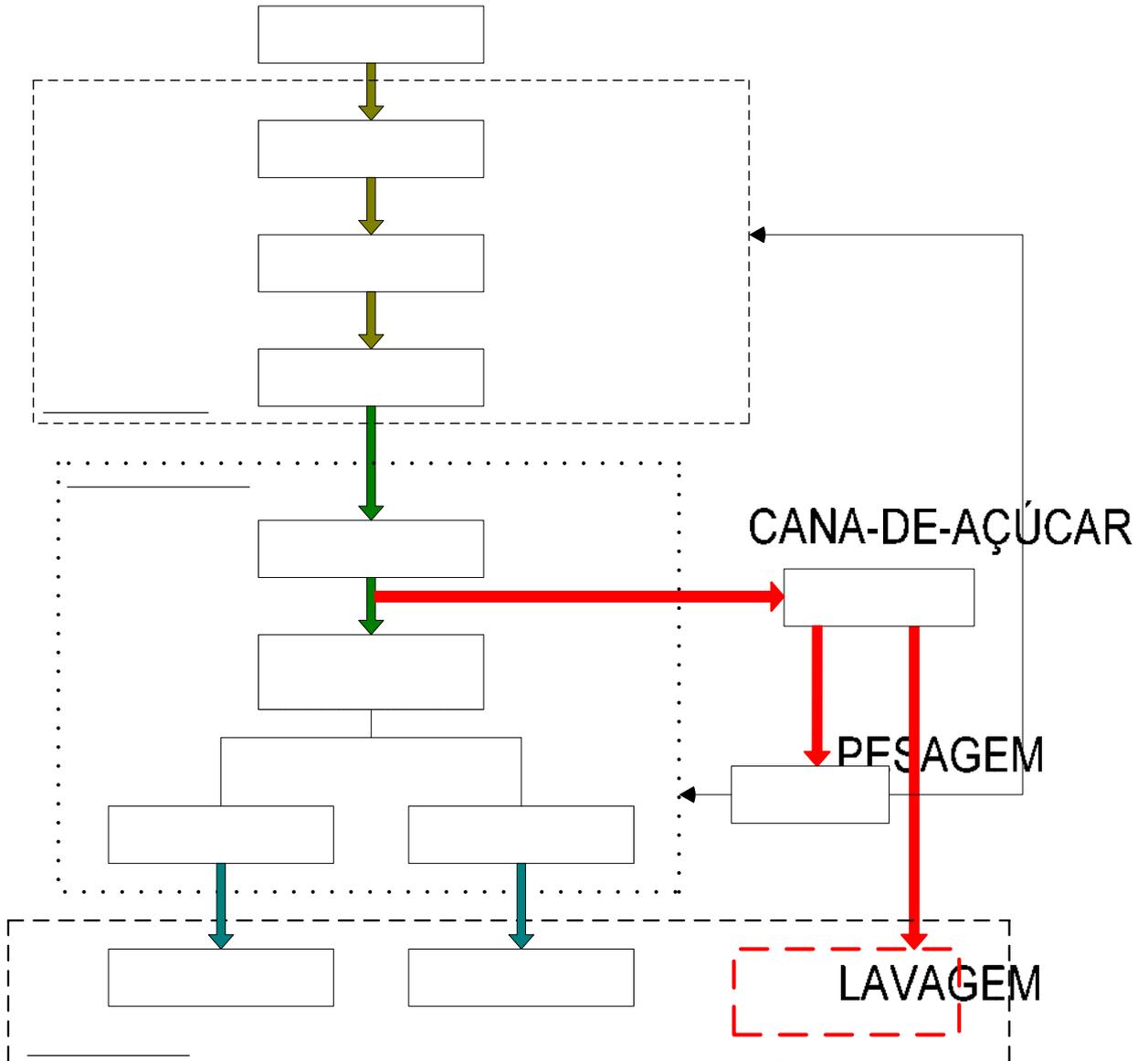


Figura 3.1: Diagrama de blocos da produção de bagaço em usinas e destilarias. (Adaptado de Schlittler, 2006).

RECEPÇÃO E PREPARO

PREPARO DA CANA

PROCESSOS INDUSTRIAIS

MOAGEM

Durante muito tempo o bagaço foi considerado um resíduo da indústria sucroalcooleira brasileira, mas, devido a estudos progressivos sobre o seu potencial de utilização, este vem sendo promovido ao *status* de matéria-prima. Além de seu potencial renovável, apresenta uma grande fonte de matéria-prima para processos biotecnológicos.

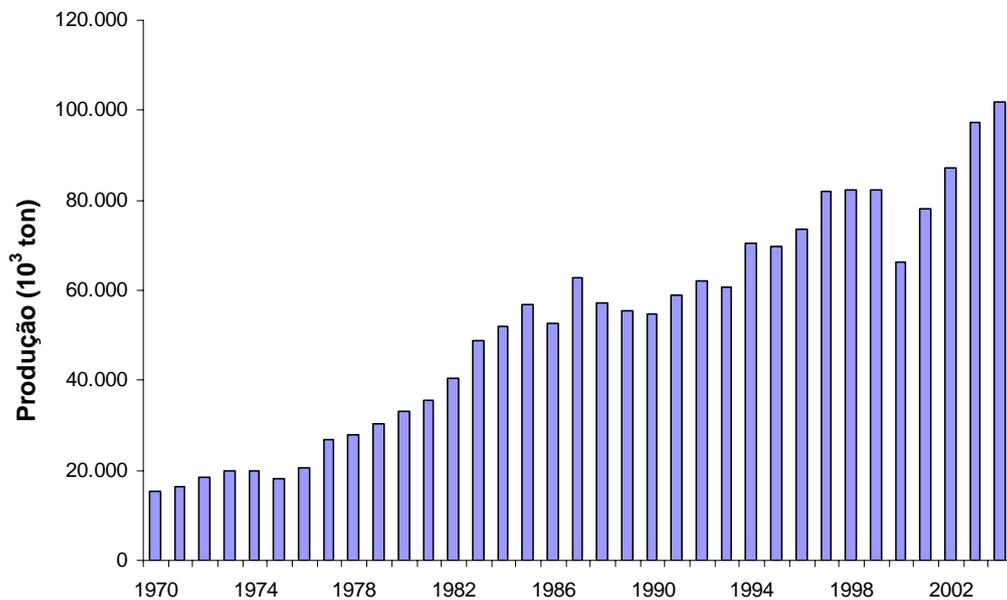


Figura 3.2: Evolução da produção de bagaço no Brasil (UNICA, 2005).

Atualmente vêm se desenvolvendo estudos de processos que permitem um aproveitamento integral das frações polissacarídicas constituintes do bagaço de cana-de-açúcar através da utilização da biotecnologia para a obtenção de substâncias de interesse e alto valor agregado.

O processo para obtenção de etanol a partir do material lignocelulósico, o qual é o objeto de estudo neste trabalho, está

sendo desenvolvido no Laboratório de Bioprocessos na Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O processo para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar é composto basicamente por duas correntes. A primeira, desenvolve tudo pertinente à fração hemicelulósica do bagaço; e a segunda, está relacionada ao aproveitamento da celulose (Figura 3.3).

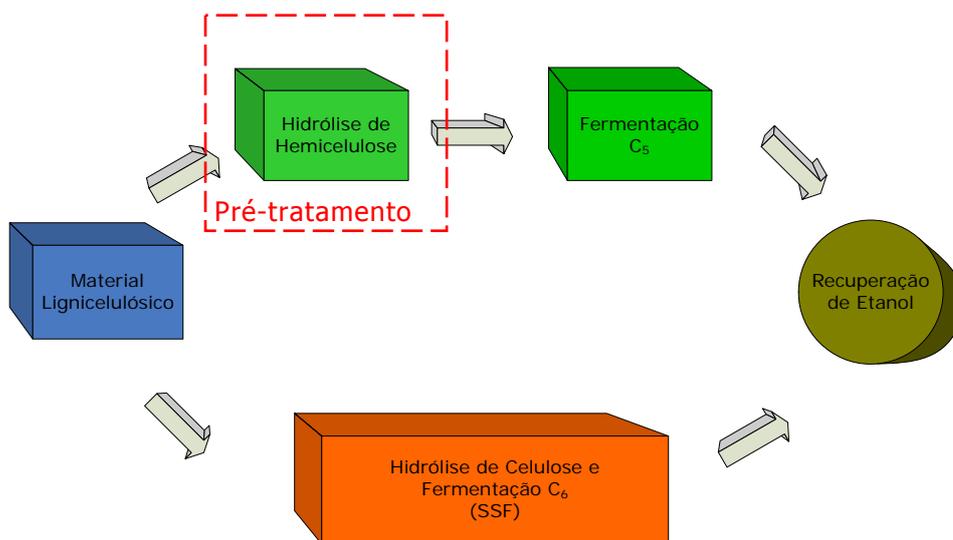


Figura 3.3: Diagrama de blocos do processo SSF (Vásquez, 2007).

Na primeira corrente ocorre a hidrólise ácida branda onde é extraída a fração de hemicelulose da matriz lignocelulósica. Segundo Betancur (2005), esse processo ocorre através da mistura em contra corrente do bagaço de cana-de-açúcar com uma solução de ácido sulfúrico e baixa temperatura.

Após esta etapa, a solução aquosa é separada, resfriada e neutralizada, para um posterior acréscimo de nutrientes e prosseguir para a etapa de fermentação das pentoses a partir da levedura *Pichia stipittis* para a obtenção do etanol. O resíduo sólido da separação do hidrolisado da primeira corrente, denominado *celulignina*, é direcionada para a segunda corrente.

Na segunda corrente, a celulignina recebe um pré-tratamento ou deslignificação para a remoção e/ou desorganização da lignina através da extração alcalina com hidróxido de sódio a 121°C. Os insumos empregados na etapa de deslignificação, fazem desta a etapa crítica do processo, onde despende o maior custo, determinando o tempo do processo, a quantidade e o preço de etanol que será produzido (Schlittler, 2006).

O sólido obtido na deslignificação é ajustado a pH 5,0 com ácido clorídrico. A etapa a seguir emprega uma pré-hidrólise enzimática associado processo SSF, no qual são empregados enzimas celulolíticas e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Estes processos ocorrem em uma única etapa, evitando inibição por produto das enzimas, possibilitando o sinergismo entre a enzima e a levedura.

A existente no processo SSF entre enzimas e leveduras sinergia (Figura 3.4) ocorre através do consumo da glicose liberada enzimaticamente pelo microrganismo.

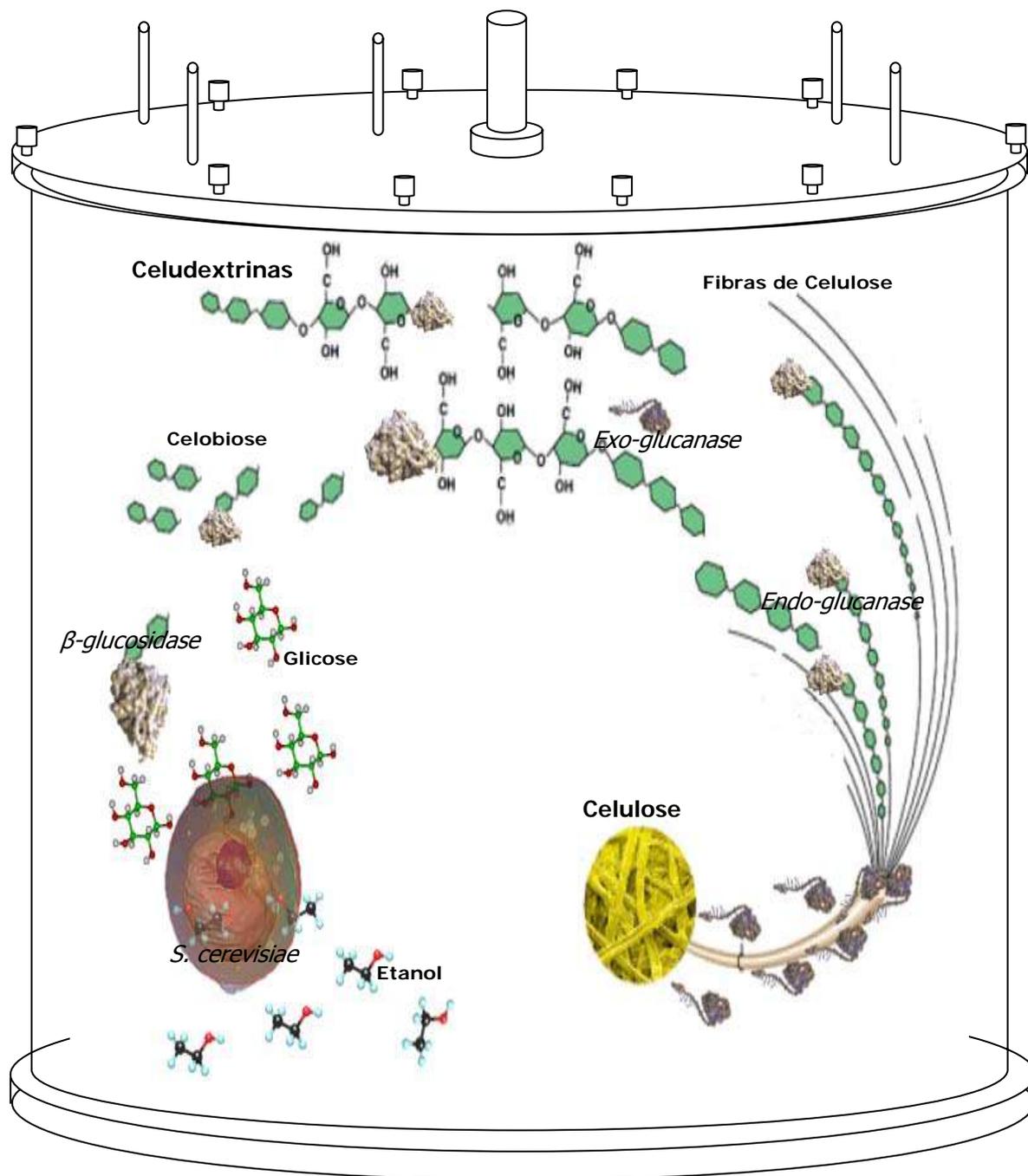


Figura 3.4: Esquema do processo SSF (Vásquez, 2007).

As principais características do processo SSF são: (Sun & Cheng, 2002; Vásquez, 2007)

- A redução da inibição enzimática pela glicose formada, devido à inexistência do acúmulo desse açúcar no meio;
- A diminuição da complexidade do processo pela existência de uma única etapa;
- O alcance de maiores índices de conversão à glicose, pois os equilíbrios das reações enzimáticas são deslocados no sentido de formação de mais produto, visto que a glicose é concomitantemente consumida;
- A minimização dos riscos de contaminação, devido às baixas concentrações de açúcar livre no meio; e
- Certo grau de desfavorecimento da cinética enzimática devido à necessidade de condução do processo em condições compatíveis com as de atuação da linhagem fermentativa da glicose.

O diagrama apresentado na figura 3.5 esquematiza as etapas do processo empregado para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. A tabela 3.1 descreve os equipamentos e o tipo de operação realizada em cada unidade marcada por uma sigla.

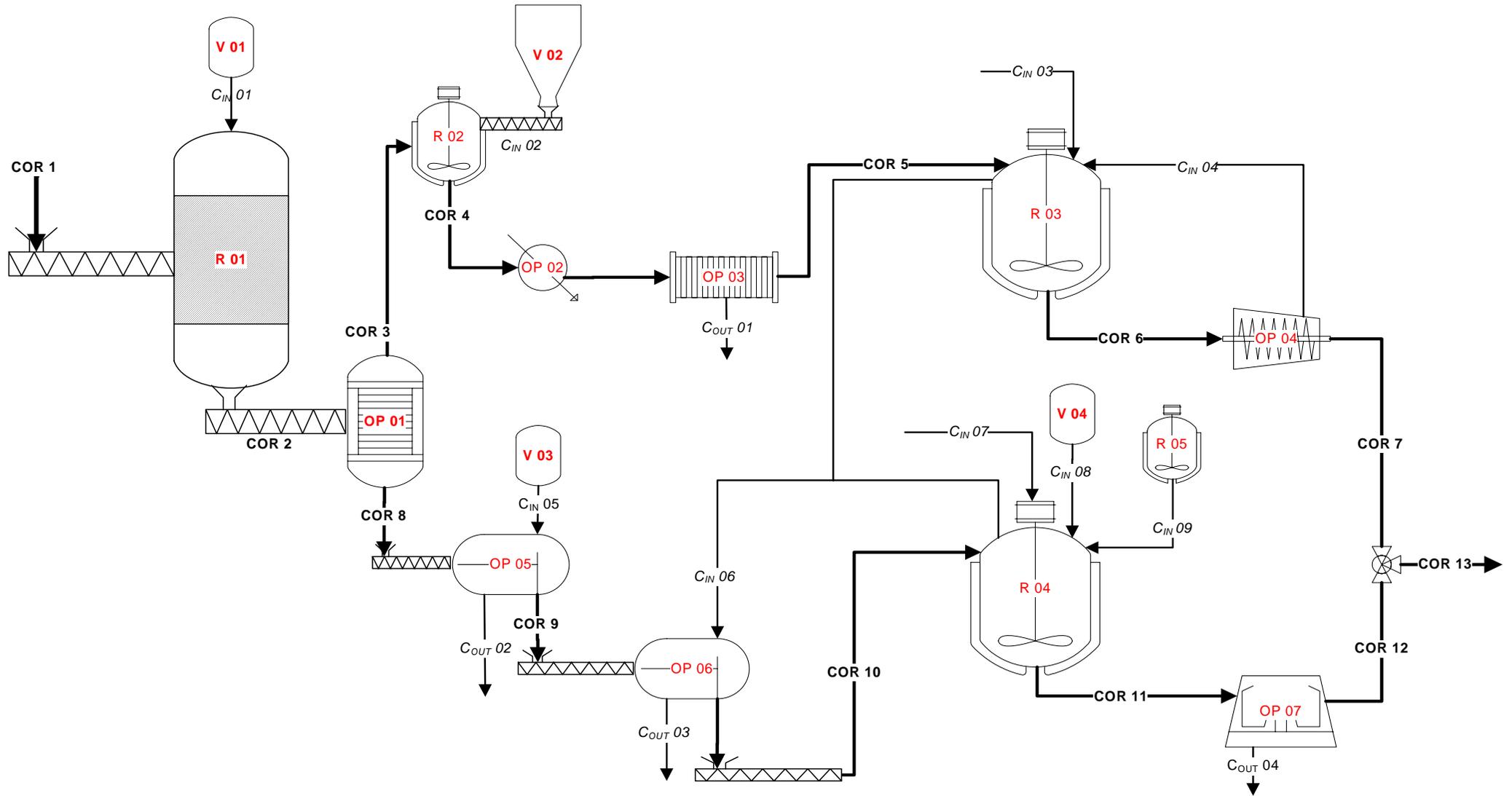


Figura 3.5: Fluxograma do bioprocesso com topologia definida (Schlittler, 2006).

Tabela 3.1: Descrição das siglas do bioprocesso da figura 3.5.

SIGLA	EQUIPAMENTO	TIPO DE OPERAÇÃO EXECUTADA
C _{in}	-	Alimentação de reagentes.
C _{out}	-	Retirada de produtos e sub-produtos.
R 01	Reator	Hidrólise do bagaço da cana.
R 02	Reator	Neutralização de parte do ácido na corrente de hidrolisado.
R 03	Fermentador	Fermentação dos açúcares contidos no hidrolisado
R 04	Fermentador	Hidrólise enzimática da celulignina com fermentação simultânea dos açúcares (SSF).
R 05	Fermentador	Propagação das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
OP 01	Filtro prensa	Separação das frações do bagaço após hidrólise.
OP 02	Trocador de calor	Resfriamento da corrente de hidrolisado.
OP 03	Filtro de placas	Remoção do gesso da corrente de hidrolisado.
OP 04	Centrífuga decantadora	Remoção de células de <i>Picchia stipitis</i> do meio fermentado.
OP 05	Extrator sólido-líquido	Remoção de parte da lignina da celulignina.
OP 06	Extrator sólido-líquido	Remoção do excesso de soda da corrente de celulignina.
OP 07	Centrífuga	Remoção de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> do meio fermentado.
V01	Tanque de armazenamento	Armazenamento de ácido sulfúrico.
V02	Silo	Armazenamento de cal.
V03	Tanque de armazenamento	Armazenamento de soda.
V04	Tanque de armazenamento	Armazenamento de enzimas.

3.2. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

O material lignocelulósico possui em sua composição em torno de 70% em massa de carboidratos, caracterizando-se como uma matéria-prima renovável e de potencial utilização em bioprocessos. Este material é composto de hemicelulose, celulose e lignina, a qual exerce um papel ligante entre os biopolímeros, conferindo rigidez às estruturas fibrosas (Lee, 1997).

A composição do material lignocelulósico é influenciada, basicamente, pelo período do ano em que é realizada a colheita, da região do cultivo, da espécie e da idade da planta. Estes mesmos fatores influenciam o tipo de glicídios constituintes da hemicelulose (Hassuani, 2005). Estes detalhes são fundamentais para a produção de diversas substâncias por rotas biotecnológicas.

3.2.1. Hemicelulose

A hemicelulose é uma macromolécula, constituída por uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular, que pode apresentar em sua composição, dependendo da origem da matéria prima, vários tipos de açúcares como: β -D-xilose, β -D-manose, β -D-glicose, α -L-arabinose, α -D-galactose, ácido β -D-glucourônico, ácido β -D-galactourônico e ácido α -D-4-O-metilglucourônico (Fonseca, 2003; Delgenes et al., 1988).

A palavra hemicelulose não compreende um único composto químico, mas sim uma gama de compostos polissacarídeos, cada um com sua peculiaridade (D'Almeida, 1988). A figura 3.6 ilustra uma estrutura típica da hemicelulose.

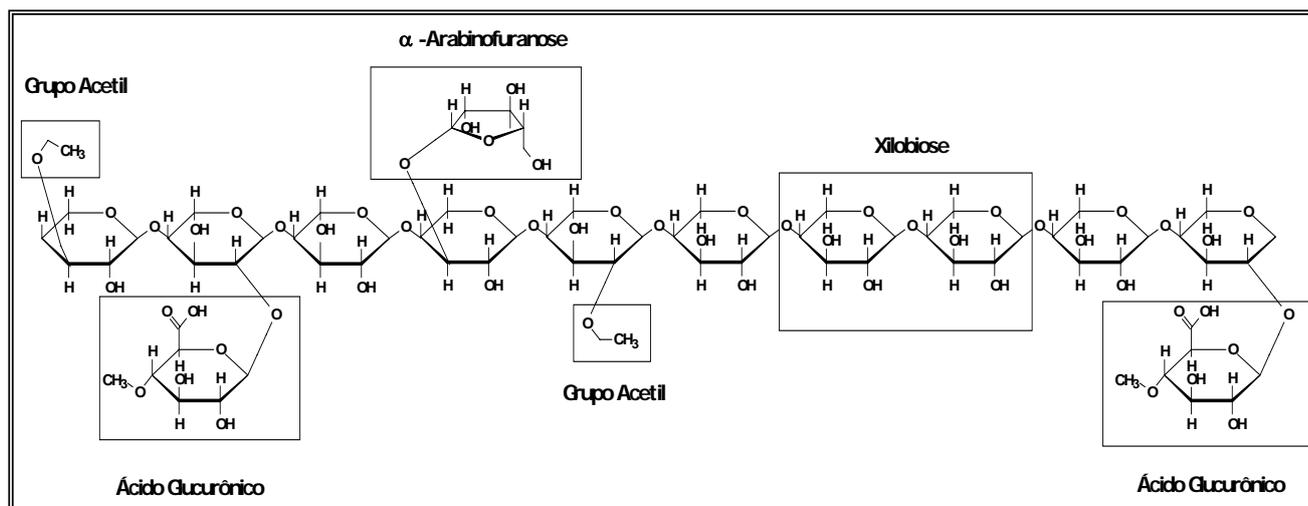


Figura 3.6: Estrutura típica da hemicelulose (Mussatto, 2002).

O resíduo da cana-de-açúcar (bagaço) possui entre 20 e 35 % da massa seca do complexo hemicelulósico composto por xilana, caracterizando-o como uma significativa fonte de biomassa renovável (Carames, 1999). As xilanas são polissacrídeos com estruturas lineares formadas por unidades de xilose unidas entre si por ligações β -1,4, possuindo algumas unidades de arabinofuranose unidas à estrutura da xilana por ligações glicosídicas α -1,3 na ausência dos grupamentos acetila.

3.2.2. Celulose

A celulose é um composto polimérico simples encontrado com frequência na natureza, nas paredes celulares dos vegetais, sendo a glicose seu elemento estrutural principal (Lemos, 2001). A celobiose, duas unidades de glicose unidas por ligações β (1-4), é a unidade de repetição do biopolímero de celulose. Dependendo da fonte de celulose, o tamanho da molécula varia entre 8000 e 14000 unidades

de glicose, apresentando massa molecular de aproximadamente 2,3 milhões de unidades de massa atômica (Shleser, 1994).

As moléculas de celulose formam ligações hidrogênio intramoleculares e intermoleculares. As ligações intramoleculares são formadas entre unidades de glicose da mesma molécula, sendo responsáveis pelo alinhamento das moléculas de glicose no polímero de celulose e a formação de microfibrilas; e as ligações intermoleculares entre as moléculas de celulose mais próximas, sendo responsáveis pela rigidez do material. As figuras 3.7 e 3.8 ilustram essas ligações, respectivamente.

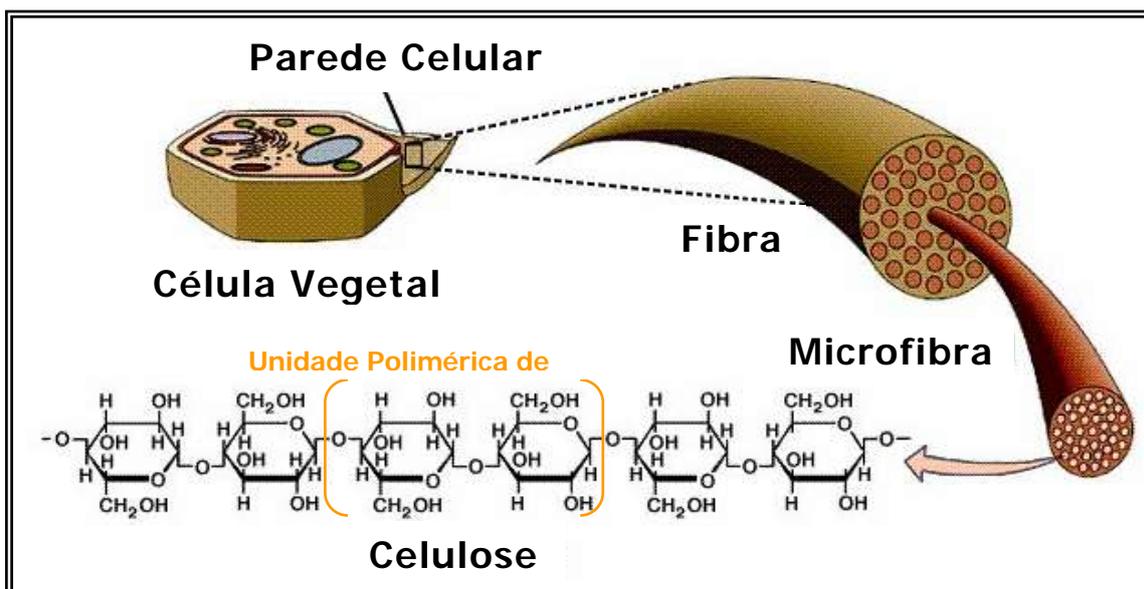


Figura 3.7: Fibras de celulose na parede das células vegetais (Moor *et al.*, 1998).

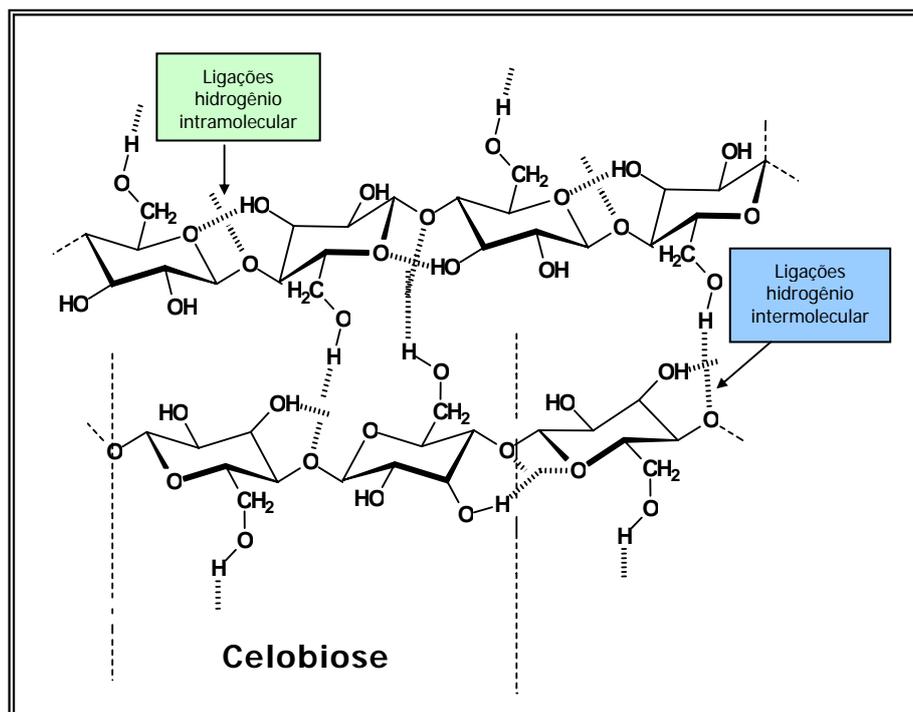


Figura 3.8: Estrutura simplificada da celulose (Pereira Jr., 1991).

Para classificação e diferenciação dos polímeros celulósicos são utilizados: o grau de polimerização (GP), que informa a frequência relativa das ligações glicosídicas internas e terminais, disponíveis para atuação respectivamente das endo e exo enzimas; e o índice de cristalinidade (IC) que está associado à reatividade do substrato. O GP é definido, a partir de sua viscosidade, com base no número médio de monômeros e no peso médio do polímero. Já o IC é quantificado por difração de raios-X, utilizando equações intrínsecas ao tipo de celulose avaliada (Sun *et al.*, 2004). A tabela 3.2 apresenta esses valores para alguns tipos de celuloses, sendo GP em quantidade de unidades monoméricas.

Tabela 3.2: Propriedades de algumas fontes celulósicas (Zhang & Lynd, 2004).

Fonte celulósica	IC	GP
Avicel	0,5-0,6	120-1000
Celulose bacteriana	0,76-0,95	2100-4500
Swollen celulose ¹	0-0,04	45-1300
Algodão	0,81-0,95	10000-18000
Papel de filtro	0,45	450-1700
Polpa de madeira	0,5-0,7	650-1700
Madeira natural	NR	2000-16000
Celodextrinas	NR	1-14

¹ Celulose tratada com ácido fosfórico; NR: Valor não reportado.

As fibras de celulose são constituídas por regiões cristalinas (moléculas com alto grau de ordenação) e regiões amorfas (moléculas com baixo grau de ordenação). Na região cristalina, as fibras têm maior resistência à tração (15 vezes maior que a região amorfa), ao alongamento, e à solvatação (absorção de solvente), na região amorfa a fibra possui maior flexibilidade (D´Almeida, 1988).

O maior desafio na utilização de materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas vem sendo a hidrólise enzimática de forma natural da celulose. Este biopolímero é bastante resistente à hidrólise devido a sua estrutura cristalina altamente organizada e a barreira física imposta pela lignina que circunda as fibras da celulose. Entretanto, existem algumas regiões amorfas, nas quais as moléculas não possuem nenhuma ordenação, sendo mais suscetíveis à hidrólise (Lemos, 2001).

Existem diferentes tipos de clivagem da ligação $\beta(1,4)$ -glicosídica da molécula de celulose. Essa clivagem gera moléculas de menor grau de polimerização e com propriedades físico-químicas diferentes (menor viscosidade e resistência mecânica). A degradação da celulose pode ser realizada biologicamente, quimicamente, termicamente e até fotometricamente.

A hidrólise química pode ocorrer em meio ácido ou alcalino. Quando o meio é ácido a degradação do material lignocelulósico requer altas concentrações de ácido e temperaturas moderadas, promovendo conversões de celulose de até 90%. Apesar disto, os processos de hidrólise ácida da celulose geram, devido às suas condições drásticas, compostos derivados da glicose (furfural), que são inibidores microbiológicos, impossibilitando as etapas de bioconversão microbiológica em processos posteriores. A hidrólise básica ocorre essencialmente a temperatura maior que 150°C a concentrações elevadas de álcalis (Badger, 2002; D´Almeida, 1988).

A degradação fotométrica ocorre na faixa do ultravioleta (UV). Já a degradação térmica é necessária uma temperatura superior a 140°C para que haja o rompimento das ligações. Ambas as reações são aceleradas na presença de ar, umidade e acidez residual (D´Almeida, 1988).

A degradação biológica é realizada através de uma hidrólise enzimática executada por um conjunto de enzimas (celulases) que são produzidas por uma ampla gama de fungos filamentosos. Essas enzimas hidrolisam as ligações $\beta(1,4)$ da celulose, atuando como um sistema multicomponente na sua degradação. O composto enzimático é formado, basicamente, por endoglucanases que agem diretamente sobre a celulose amorfa produzindo, aleatoriamente, oligômeros de

até 6 unidades de glicose; exoglucanases ou celobioidrolases que agem sobre os extremos da celulose cristalina produzindo, principalmente, celobiose e glicose; e celobiasas ou β -glucosidasas que hidrolizam a celobiose formando glicose (Lynd *et al.*, 2002).

Consórcio enzimático de celulases: A vantagem de utilizar enzimas celulolíticas na hidrólise da celulose é que atuam sob condições brandas de pressão, temperatura e pH, possuem uma alta especificidade, eliminando a chance de produção de furfurais que dificultam os processos subseqüentes. Esse consórcio enzimático se divide em três grupos de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico (Lynd *et al.*, 2002; Henrissat, 1991):

As endoglucanases são enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise clivando randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando como produtos, oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor. Com isso, essas enzimas geram uma rápida solubilização do polímero celulósico (reduzindo o grau de polimerização), devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (Kleman-Leyer *et al.*, 1996; Lynd *et al.*, 2002).

O grupo das exoglucanases é constituído pelas glucanohidrolases (GHs) que liberam glicose diretamente dos terminais do polímero; e pelas celobiohidrolases (CBHs) que participam da hidrólise primária da fibra sendo as responsáveis pela amorfogênese. Esse fenômeno promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões cristalinas mais expostas ao processo de hidrólise enzimática (Zhang & Lynd, 2004; Lynd *et al.*, 2002).

As CBHs podem ainda ser divididas como enzimas do tipo I (CBHs I) que hidrolisam terminais redutores (R) e enzimas do tipo II (CBHs II) que hidrolisam terminais não redutores (NR). Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu próprio produto de hidrólise (celobiose) (Awafo, 1997; Laureano-Perez *et al.*, 2005).

As β -glucosidases hidrolisam celobiose e oligossacarídeos solúveis (GP<7) à glicose, sofrendo inibição por seu produto de hidrólise igualmente as celobiohidrolases (Awafo, 1997).

O rendimento apresentado pelas enzimas do complexo celulásico ao atuarem em conjunto é maior que a soma dos rendimentos ao atuarem isoladamente, o que demonstra seu efeito sinérgico, o qual pode ser descrito por três formas (Lynd *et al.*, 2005, Lynd *et al.*, 2002; Bhat & Bhat, 1997):

Sinergia EG-ExG: As endoglucanases agem nas regiões amorfas da fibra, disponibilizando terminais redutores e não redutores para ação das CBH I e CBH II, respectivamente.

Sinergia ExG-ExG: As CBH I e CBH II agem simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados pela ação das endoglucanases (EG).

Sinergias ExG-BG e EG-BG: As celobiohidrolases e endoglucanases liberam, como produtos de hidrólise, celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para as β -glucosidases.

Na tabela 3.3 estão listadas algumas diferenças entre celulose e hemicelulose.

Tabela 3.3: Diferenças entre hemicelulose e celulose (D´Almeida, 1988).

CELULOSE	HEMICELULOSE
Unidades de glicose unidas entre si	Unidades de diferentes açúcares ligadas entre si (arabinose manose, glicose, xilose, etc.)
Apresenta grau de polimerização elevado (8000 a 14000 unidades de glicose)	Apresenta grau de polimerização baixo (60 a 200 unidades de açúcares)
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Possui regiões amorfas e cristalinas	Possui somente regiões amorfas
É atacada lentamente por ácido mineral diluído quente	É atacada rapidamente por ácido mineral diluído quente
É insolúvel em álcali	É solúvel em álcali

3.2.3. Lignina

A lignina confere rigidez à parede celular, esta substância age como agente de ligação permanente intercelular formando uma estrutura resistente ao impacto, compressão e dobra. Além disso, a sua distribuição na parede celular é uma forma de proteção aos ataques de microrganismos e enzimas a estrutura celulósica e hemicelulósica, desempenhando um papel de proteção.

A lignina pode ser encontrada em diversos tipos de plantas, mas sua constituição não é igual em todas elas, já que apresenta-se como uma substância química irregular. Encontra-se presente em madeiras e tecidos vasculares de todas as plantas superiores, ocupando aproximadamente 30% de sua composição, conferindo rigidez ao

tecido. Grande parte da lignina encontra-se na parede celular ligada à xilana da hemicelulose, formando uma matriz envolvente as fibras de celulose (D´Almeida, 1988).

A lignina é formada pela polimerização enzimática desidrogenativa dos álcoois trans-coniferílico, trans-p-cumarílico e trans-sinapílico, os quais produzem uma molécula heterogênea opticamente inativa e com múltiplas ligações cruzadas.

3.3. UTILIZAÇÃO DO ETANOL COMO COMBUSTÍVEL

Nos primórdios da civilização o etanol era produzido principalmente para consumo humano como bebidas e conservas. O etanol que não é próprio para o consumo humano é encaminhado para outras aplicações como solvente em fármacos, perfumes, vernizes e corantes.

Atualmente, o etanol é, basicamente, empregado como combustível, devido ao seu alto teor de oxigênio e a sua combustão "limpa", e como aditivo para combustíveis fósseis, com a substituição do MTBE que é altamente poluente. O etanol é também empregado como matéria-prima para a produção de glicóis, ésteres de glicóis, etanoaminas, etilaminas, etilpropenoatos, ésteres de acetatos e para a biotransformação; como fonte de hidrogênio para seu aproveitamento em células combustível; como solvente e para bebidas alcoólicas (CRUEGER & CRUEGER, 1993; SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005).

Cerca de 85% da produção do etanol é utilizada no setor de combustíveis (como aditivos ou queima direta), o restante da produção no setor industrial e na fabricação de bebidas (ANP, 2007).

3.3.1. Potência do Etanol como Combustível

Com as contínuas crises do petróleo culminando em crescentes aumentos nos preços de seus derivados, o etanol vem se mostrando como uma excelente alternativa para que o setor de transporte consiga reduzir sua dependência dos combustíveis derivados do petróleo, mais especificamente em substituição da gasolina.

A procura pela substituição da gasolina por etanol, no Brasil, vem desde a criação do programa nacional do álcool (Proálcool) na década de 70, tornando-se mais acentuada a partir de 2002 com a criação dos veículos flex-fuel (movidos tanto a gasolina quanto etanol). Desde a criação destes automóveis, suas vendas tem tido altos crescimentos, alcançando em janeiro de 2007 uma proporção de 84% das vendas contra aproximadamente 10,8% dos veículos movidos somente a gasolina (ANFAVEA, 2007).

3.3.2. Etanol como aditivo a gasolina

O etanol, como aditivo na gasolina, é utilizado com o intuito de melhorar o rendimento da combustão aumentando a quantidade de oxigênio na mistura combustível, e reduzindo as emissões de poluentes gerados pelos aditivos tradicionais.

Os aditivos tradicionais como o chumbo tetraetila, o MTBE (éter metílico terc-butílico), o ETBE (éter etílico terc-butílico) e o TAME (éter metílico terc-amílico) aumentam o índice de octanos e oxigenadores da gasolina. Porém, as emissões causadas por estes aditivos ocasionam uma deterioração da atmosfera, o surgimento da chuva ácida, do "smoog", do desgaste do motor e da geração de subprodutos agressivos ao organismo humano.

Alguns países como os Estados Unidos e Tailândia, que são os maiores produtores mundiais de MTBE, estão optando pela produção e substituição desta substância pelo isooctano ou o etanol que desempenham a mesma função e são muito menos agressivos ao ambiente. No Brasil, a mistura do MTBE-gasolina foi proibida em 1999, favorecendo ao desenvolvimento e comercialização do etanol para esse fim (SANTOS, 2002).

3.3.3. Vantagens da Utilização do Etanol

Algumas vantagens ambientais são percebidas com o uso do etanol como combustível e/ou aditivo (SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005; PEREIRA Jr., 1991; OMETTO *et al.*, 1985 *apud* LEAL, 1998; SANTOS, 2000a):

- Redução nas emissões do dióxido de enxofre, particulados e outras substâncias poluentes, redução que é maior quando utilizado o etanol anidro que o etanol hidratado.
- Na combustão incompleta, o etanol gera acetaldeído, substância menos agressiva para a saúde humana que o formaldeído, o qual é gerado na combustão incompleta da gasolina.
- Não interfere no desbalanceamento global no ciclo do carbono que tem tido um aumento gradual das concentrações atmosféricas do dióxido de carbono gerado por combustíveis fósseis, que são derivados de fontes não renováveis, ocasionando o "efeito estufa". Este fato destaca o Brasil como responsável pela redução de 9,5 milhões de toneladas de

dióxido de carbono à atmosfera. Adicionalmente, o etanol apresenta menores prejuízos ambientais que os demais combustíveis oxigenados em derramamentos e vazamentos.

- O etanol utilizado como aditivo na gasolina apresenta o melhor desempenho, comparado com outros aditivos, auxiliando na redução das emissões poluentes nitrogenados e carbonados, combatendo o efeito estufa e contribuindo para o desenvolvimento da agroindústria.
- A possibilidade de produção de etanol próximo ao local onde será empregado, utilizando resíduos agro-industriais, enquanto o petróleo depende da localização dos poços para poder ser extraído (Ferreira, 2002).

3.4. BALANÇO MATERIAL DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL

Em algumas operações de separação entre fases sólidas e líquidas considerou-se uma perda de material de 10% e para outras foram estimados rendimentos através do método heurístico e da experiência prévia do processo; 25°C para as condições de temperatura do processo; massa de 1000 toneladas de bagaço de cana-de-açúcar; consideraram-se uma eficiência de 60% na deslignificação, de 90% de hidrólise da fração hemicelulósica, 85% de hidrólise da fração celulósica e, 81% e 90%, respectivamente, de fermentação das frações hemicelulósicas e celulósicas, se baseando em estudos realizados em bancada (Schlittler, 2006).

Do balanço de massa, obteve-se 121,84 toneladas de etanol (um volume de 162132,00 L de etanol a 25°C) por cada 1000 toneladas de bagaço (base úmida), no qual 55% desse volume advém da fração celulósica e 45% da fração hemicelulósica.

Em relação ao consumo, o processo demandou uma grande quantidade de insumos (Tabela 3.4) sendo a deslignificação a que obteve maior porcentagem dentre as etapas. Nesse processo foram empregadas 220 toneladas de hidróxido de sódio para remover a lignina (Schlittler, 2006).

Tabela 3.4: Quantidade de insumos utilizados no processo (Schlittler, 2006).

Insumo	ton/1.000 ton de bagaço	Kg/L etanol produzido
ÁGUA	7.936,228	48,949
H ₂ SO ₄	54,870	0,338
NaOH	219,659	1,355
CaO	28,236	0,174
Enzimas	52,974	0,327
Nutrientes	1,290	0,008

No processo foram gerados diversos tipos de resíduos e subprodutos como a lignina, sulfato de cálcio e carbonatos de cálcio, sendo os principais: celulose não hidrolisada no processo SSF, açúcares não metabolizados ou perdidos no processo, enzimas utilizadas no processo que não possuem reaproveitamento e dióxido de carbono gerado nas fermentações como subproduto podendo ser utilizado em outros processos.

3.5. AVALIAÇÃO ECONÔMICA

Segundo Schlittler (2006) o investimento variável ou custo de produção em um processo para produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar (material lignocelulósico), varia de acordo com o esquema de produção escolhido, dependendo fortemente das condições do processo, do tipo e quantidade de insumos utilizados, principalmente no pré-tratamento e no aproveitamento dos resíduos e subprodutos gerados.

No investimento variável, o custo dos produtos é relativo, variando em relação à qualidade do produto, época do ano e localização da produção. Em virtude da relatividade deste custo, criaram-se três cenários para avaliar a viabilidade econômica deste processo.

No primeiro cenário a unidade é implementada na condição autônoma (não há nenhuma interação entre os processos que permita compartilhar facilidades comuns). O segundo cenário está dentro do contexto de unidades associadas, o qual possui o intuito de reduzir o custo de produção. No terceiro cenário a proposta foi reunir o contexto de unidades associadas com o que atualmente denomina-se biorrefinaria.

Primeiro cenário: No contexto de unidade autônoma não há nenhum tipo de interação com outros processos, sem existir a possibilidade de compartilhar as facilidades comuns em relação a insumos, utilidades e energia.

Segundo cenário: As unidades do processo de produção de etanol estão associadas às unidades maiores das usinas, conseguindo que o custo de produção caía e traga inúmeras vantagens ao processo: redução do capital fixo de investimento, aproveitamento de facilidades já existentes, redução do custo de matéria-prima, auto-sustentabilidade energética. Com isso, se reduz o preço do produto, em relação ao processo anterior (primeiro cenário), tornando-o mais atraente e viável.

Terceiro cenário: Além do etanol, obtém-se, subprodutos e rejeitos com maior valor agregado (gesso, sais minerais e açúcares não metabolizados) podendo ser comercializados com outras indústrias e inserindo-o dentro do contexto de unidades associadas temos o conceito de biorrefinaria; que permite que o etanol produzido atinja um custo de produção bem menor, sendo competitivo frente ao etanol de caldo de cana.

Os cenários nos quais são empregadas a unidade autônoma (Cenário 1) e unidade associada (Cenário 2) com o modelo de operação, geram álcool de custos elevados (US\$ 1,436 e US\$ 1,158, respectivamente) valores que não são competitivos no mercado onde o preço do etanol está entre US\$ 0,24-0,28/L. O processo descrito pelo terceiro cenário, o qual incorpora o conceito de biorrefinaria, produz etanol a preços competitivos (US\$ 0,279) no mercado atual.

CAPÍTULO 4

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MICRORGANISMO

O microrganismo empregado na fermentação alcoólica deste projeto foi a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura é produzida pela indústria *Fleischmann* para ser utilizada nos processos de panificação.

4.2. MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima utilizada neste projeto foi a *celulignina*, a qual é proveniente da etapa de hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar, *Saccharum spp*, fornecido pela usina “Costa Pinto” em Piracicaba, São Paulo, Brasil. Nesta etapa a fração hemicelulósica é convertida em açúcares (pentoses), gerando este sólido residual (Betancur, 2005).

4.3. PROCESSOS DE DESLIGNIFICAÇÃO

O pré-tratamento ou deslignificação empregado no processo SSF, para a produção de etanol, promove um aumento da acessibilidade das enzimas à fibra de celulosa.

As condições empregadas na deslignificação foram: solução 4% (m/v) de hidróxido de sódio, relação sólido:líquido de 1:20 (g:mL) e temperatura de 121°C por 30 minutos (Aguiar & Menezes, 2002; Vásquez, *et al.*, 2006).

Após esta etapa, a *celulignina* foi lavada e o pH ajustado em 5,5. Finalmente, a secagem foi realizada em estufa a 50°C por 24 horas.

4.4. CONSÓRCIO ENZIMÁTICO

O consórcio enzimático comercial de celulases, o qual obteve os melhores resultados na hidrólise enzimática da *celulignina* pré-tratada, foi GC220, fornecido pela indústria *Genencor International*. A atividade enzimática deste consórcio é 104,29 FPU/mL de preparado (Vásquez, 2007).

4.5. PRÉ-HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS

O processo de pré-hidrólise enzimática foi o responsável pela liberação, em altas taxas, de moléculas de glicose, visto que a temperatura ótima da pré-hidrólise enzimática difere da temperatura ótima do metabolismo da levedura. Vásquez (2007)

reportou, que para este processo, a liberação de glicose estabiliza-se em torno de 10 horas.

As condições empregadas na pré-hidrólise enzimática foram: temperatura a 47°C, meio tamponado com citrato de sódio (pH 5,0), carga enzimática 26 FPU/g de *celulignina* deslignificada e teor de sólido alterado para 20% (Vásquez *et al.*, 2007).

Após as 10 horas de pré-hidrólise, iniciou-se o processo SSF, reduzindo a temperatura para 37°C e inoculando-se 4 g/L em peso seco da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

4.6. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESLIGNIFICAÇÃO

Com o intuito de minimizar as quantidades de hidróxido de sódio sem afetar as taxas de produção de etanol foi realizado um planejamento experimental fatorial completo de 2 fatores em 3 níveis (3^2) e 4 repetições do ponto central. Os fatores considerados neste planejamento foram a porcentagem de hidróxido de sódio (%NaOH) e a relação sólido:líquido (S:L) em g:mL; como variável de resposta foi analisada a concentração final de etanol. A Tabela 4.1 apresenta os níveis, superior e inferior, dos fatores analisados e a Tabela 4.2 mostra a matriz experimental do planejamento fatorial completo.

Tabela 4.1: Intervalos utilizados para construir o planejamento experimental (3^2) para o processo de deslignificação.

Fatores	Nível Inferior (-1)	Ponto Central (0)	Nível Superior (1)
%NaOH (m/v)	1,0	2,5	4,0
Relação sólido:líquido (g:mL)	1:10	1:15	1:20

Tabela 4.2: Matriz do Planejamento Experimental para a Minimização da % de NaOH da deslignificação.

Exp.	S:L (g:mL)	%NaOH (m/v)
1	15	2,5
2	10	4,0
3	15	2,5
4	15	1,0
5	15	2,5
6	20	1,0
7	15	2,5
8	15	2,5
9	10	2,5
10	15	4,0
11	20	2,5
12	20	4,0
13	10	1,0

As condições da pré-hidrólise enzimática e do processo SSF foram citadas no item 4.5.

Estes experimentos foram realizados em fermentômetros, dispositivos que permitem a quantificação do CO_2 liberado durante o metabolismo da levedura por diminuição no peso.

4.7. VALIDAÇÃO DA CONDIÇÃO ÓTIMA EM BIORREATOR

A validação das condições ótimas foi realizada em um reator BIOFLO III (New Brunswick), com um volume nominal de 1,5 litros e um volume útil de 1,2 litros, 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), controle de concentração de oxigênio dissolvido (Eletrodo polarográfico prata/platina, INGOLD) 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 2 turbinas de 3,5 cm de diâmetro, com 6 pás em cada uma e três chicanas no vaso reacional.

4.8. METODOLOGIA ANALÍTICA

4.8.1. Amostras

O tratamento dado às amostras segue a seguinte seqüência: centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos, recuperação do sobrenadante e diluição para a quantificação dos metabólitos, celobiose, glicose e etanol.

4.8.2. Quantificação dos Metabólitos

A quantificação dos metabólitos, celobiose, glicose e etanol, foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando o sistema cromatográfico (WATERS) composto por uma coluna HPX-87P (Bio-Rad), bomba WATERS 510, detector

de índice de refração WATERS 410 e integrador HP 3390A. As condições operacionais estão descritas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Condições operacionais do cromatógrafo.

Fase móvel: água Milli-Q degaseificada
Vazão: 0,6 mL/min
Pressão: 1000 psi
Temperatura da coluna: 80°C
Temperatura do detector: 40°C
Atenuação: 4
Volume de "looping": 20 µL
Velocidade do papel: 0,1 cm/min

A determinação das concentrações de cada metabólito nas amostras foi realizada através da comparação entre as áreas dos padrões e as áreas das amostras, de acordo com a correlação abaixo:

$$C_{\text{amostra}} = \left(A_{\text{amostra}} \times C_{\text{padrão}} / A_{\text{padrão}} \right) \times D$$

Sendo:

C_{amostra} : concentração da amostra analisada;

A_{amostra} : área da amostra dada pelo cromatógrafo;

$C_{\text{padrão}}$: concentração da substância na solução padrão;

$A_{\text{padrão}}$: área da substância na solução padrão dada pelo cromatógrafo;

D: fator de diluição das amostras.

A solução padrão utilizada nesta análise era composta por 2,5 g/L de celobiose, 10 g/L de glicose e 15 g/L de etanol.

4.8.3. Quantificação da Atividade Enzimática

As três atividades enzimáticas características das celulasas, FPÁsica, CMCásica e β -glucosidásica, foram quantificadas. As atividades foram determinadas 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°C , utilizando como substrato papel de filtro (Watman N°1). Uma unidade de atividade CMCásica é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de açúcares redutores por minuto por mL a uma temperatura de 50°C , utilizando como substrato carboximetilcelulose (SIGMA). Uma unidade de atividade β -glucosidásica é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de glicose por minuto por mL a uma temperatura de 50°C , utilizando como substrato celobiose (SIGMA).

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CINÉTICAS EM FERMENTÔMETROS

As fermentações para avaliar os pré-tratamentos da matriz do planejamento experimental foram realizadas em fermentômetros (Figura 5.1). Os perfis cinéticos para cada nível de teor de hidróxido de sódio com as respectivas combinações de relação sólido:líquido apresentam-se nas Figuras 5.2, 5.3 e 5.4.

Na Figura 5.2 nota-se que com a redução da relação sólido:líquido, houve um aumento na concentração de etanol equivalente liberada na fermentação. Assim, o teor de hidróxido de sódio de 4% promoveu uma melhora na acessibilidade das enzimas, resultando em um aumento gradual da concentração de etanol de acordo com a relação sólido:líquido empregada.

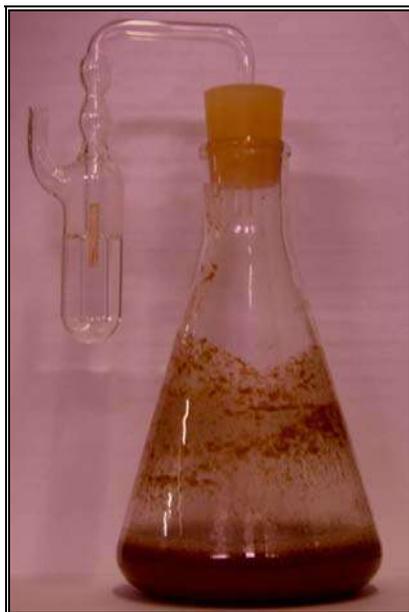


Figura 5.1: Fermentômetro usado nas fermentações.

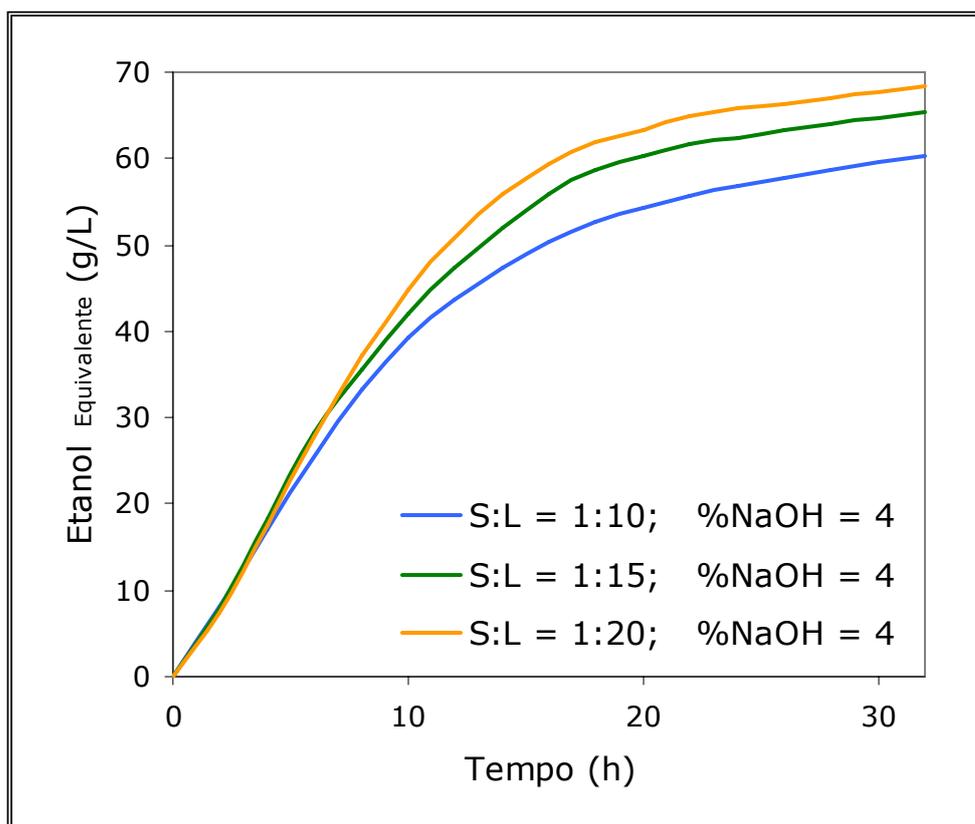


Figura 5.2: Perfil cinético da fermentação da *celulignina* pré-tratada com 4% de NaOH.

A Figura 5.3 apresenta o perfil cinético da fermentação da *celulignina* pré-tratada com 2,5% de hidróxido de sódio. Pode-se perceber que o perfil apresentou a mesma tendência para todas as relações sólido:líquido, porém a concentração de etanol equivalente aumentou a medida que a relação sólido:líquido empregada no pré-tratamento foi reduzida.

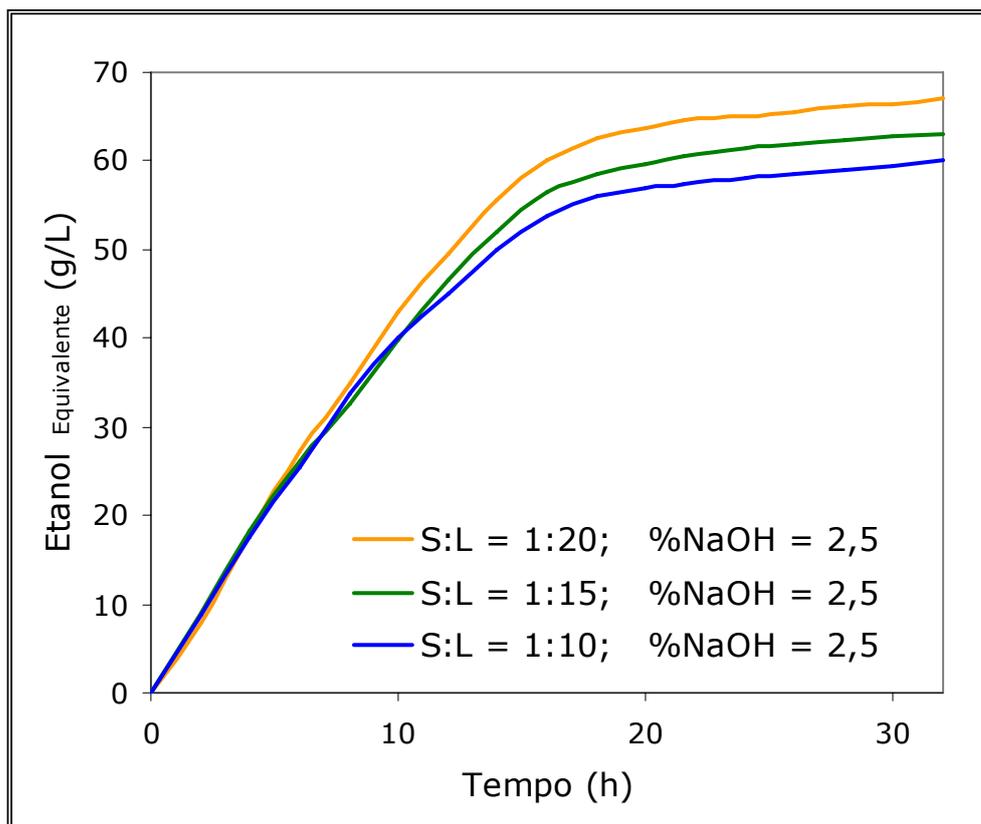


Figura 5.3: Perfil cinético da fermentação da *celulignina* pré-tratada com 2,5% de NaOH.

O experimento que empregou 1% de hidróxido de sódio (Figura 5.4) apresentou a mesma tendência dos perfis cinéticos. Porém, diferentemente, dos outros experimentos, a concentração final de etanol equivalente foi similar para as relações sólido:líquido de 1:15 e 1:20. Pode-se perceber que 1% de hidróxido de sódio e uma relação de 1:15 foi suficiente para promover a deslignificação necessária para aumentar a

acessibilidade das enzimas à celulose, e relações sólido:líquido maiores não induzem ao incremento da concentração final de etanol equivalente, mas sim ao desperdício de água e NaOH. O pré-tratamento que empregou a relação sólido:líquido de 1:10 teve uma grande redução na concentração final de etanol equivalente, o que pode ser explicado pela saturação da água por substâncias fenólicas retiradas das fibras da celulignina durante o pré-tratamento, sendo este mais concentrado em sólidos.

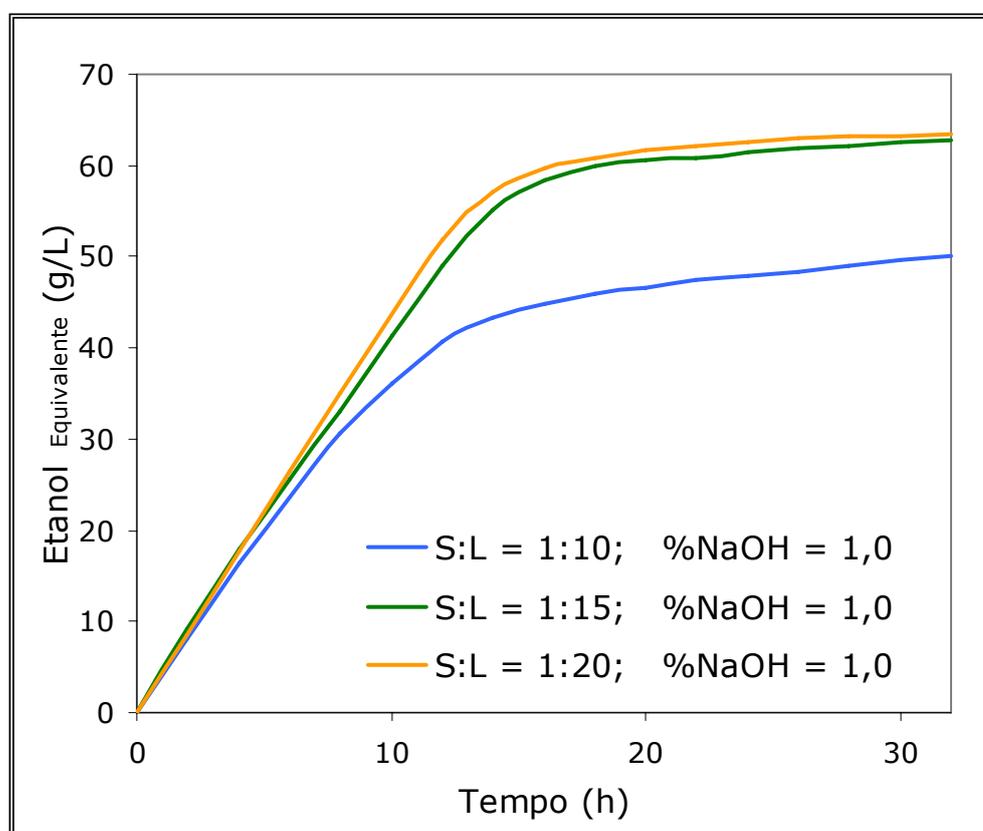


Figura 5.4: Perfil cinético da fermentação da *celulignina* pré-tratada com 1% de NaOH.

Comparando as Figuras 5.2, 5.3 e 5.4, nota-se que a concentração final de etanol equivalente não foi fortemente impactada pela redução da porcentagem de hidróxido de sódio

empregada no pré-tratamento, mas sim, pela redução da relação sólido:líquido.

5.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo para a minimização do teor de hidróxido de sódio empregado no pré-tratamento foi realizado através de um planejamento experimental completo de dois fatores e três níveis com quatro repetições do ponto central, apresentado na Tabela 4.2 do Item 4.6.

Este planejamento permite a determinação dos efeitos lineares e quadráticos das variáveis, assim como a obtenção dos pontos máximos ou mínimos dentro da faixa avaliada.

A Tabela 5.1 apresenta a matriz experimental e a concentração final de etanol, variável de resposta, correspondente a cada experimento.

Tabela 5.1: Concentração final de etanol.

Exp.	Relação S:L (g:mL)	%NaOH (m/v)	Concentração de Etanol (g/L)
1	15	2,5	51,78
2	10	4,0	48,54
3	15	2,5	55,45
4	15	1,0	52,15
5	15	2,5	54,90
6	20	1,0	50,55
7	15	2,5	52,12
8	15	2,5	56,15
9	10	2,5	50,40
10	15	4,0	54,78
11	20	2,5	55,77
12	20	4,0	55,07
13	10	1,0	45,80

A análise de variância (Tabela 5.2) mostrou que o modelo estatístico obteve um ajuste adequado aos resultados experimentais, sendo este de 82%, o que é confirmado pela falta de ajuste sem significância estatística ($p\text{-level} > 0,05$). Nesta tabela são avaliados os efeitos simples (lineares e quadráticos) e das interações lineares entre os fatores, assim como a falta de ajuste e o erro puro; são calculados os desvios quadráticos, devidos à fonte de variação.

Tabela 5.2: Análise de variância (ANOVA) dos fatores do pré-tratamento na produção de etanol ($R^2 = 0,82$).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _o	p-level
S:L (L) →1	46,204	1	46,204	15,727	0,00542
S:L (Q)	13,273	1	13,273	4,518	0,07113
%NaOH (L) →2	16,302	1	16,302	5,549	0,05067
%NaOH (Q)	9,071	1	9,071	3,088	0,12231
2L e 1L	0,792	1	0,792	0,270	0,61960
Erro Residual	20,565	7	2,938		
Falta de ajuste	4,599	3	1,533	0,384	0,77110
Erro Puro	15,966	4	3,991		
Total	119,780	12			

A análise estatística dos resultados do planejamento experimental também permitiu construir o gráfico de Pareto (Figura 5.5). Neste gráfico pode-se verificar a significância estatística dos fatores ($p\text{-level} < 0,05$) e a magnitude do efeito estimado de cada variável.

O valor do p-level garante, com um nível de confiança de 95% que o fator influencia na variável de resposta analisada; este valor é usualmente assumido em pesquisas biotecnológicas analisadas estatisticamente (Montgomery, 2001; Calado & Montgomery, 2003 e Vásquez, 2007).

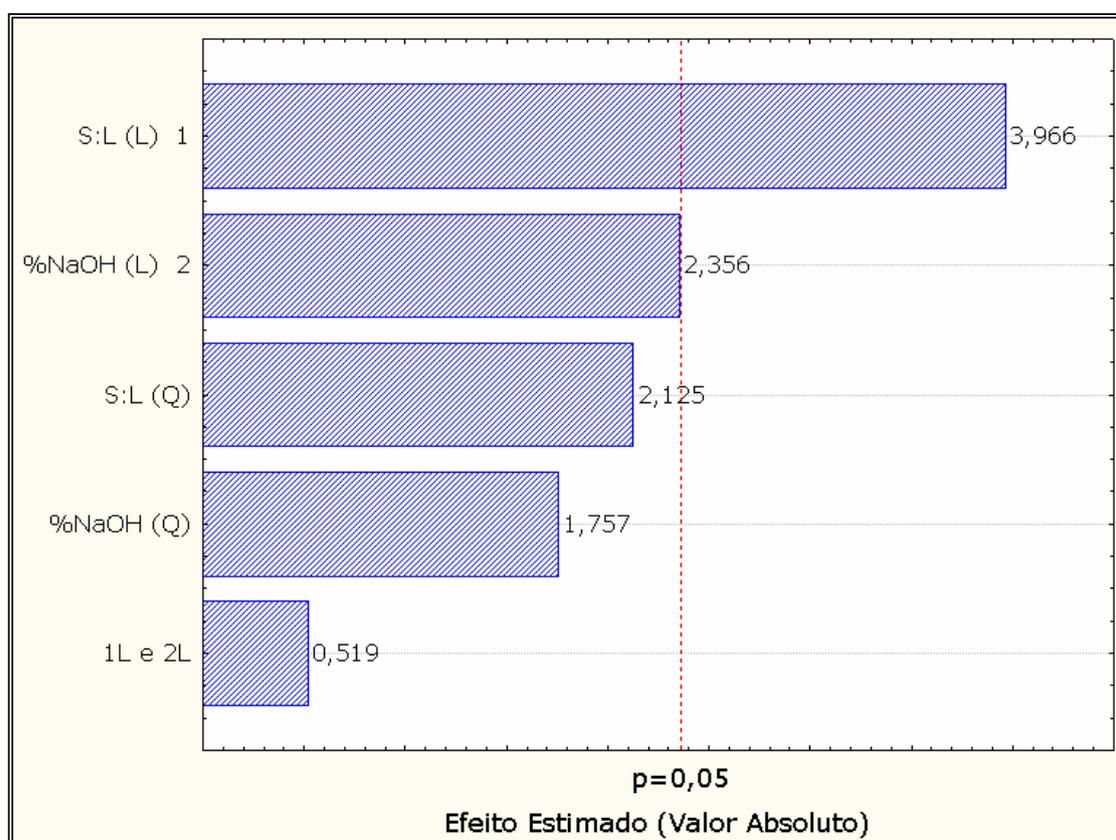


Figura 5.5: Gráfico de Pareto de Efeitos Padrão para os pré-tratamentos do planejamento experimental.

É possível observar que o maior efeito positivo sobre a concentração final de etanol foi a relação sólido:líquido, seguido pelo efeito marginal do teor de hidróxido de sódio. Os efeitos

quadráticos e a interação não se apresentaram com significância estatística sobre a variável de resposta.

A ordem e os valores dos efeitos apresentados na análise estatística realizada pelo método de Fisher (análise de variância) são semelhantes aos apresentados na análise realizada empregando a estatística t de Student, conforme ilustrado na Tabela do ANOVA (Tabela 5.2) e no gráfico de Pareto (Figura 5.5), respectivamente.

Pode-se perceber que o modelo quadrático proposto pelo planejamento ajustou-se adequadamente aos pontos experimentais, confirmado pelo coeficiente de correlação. A tendência dos dados experimentais pode ser representada, com boa aproximação, pela seguinte função quadrática codificada:

$$\text{Etanol} = 54,42 + 2,77 * A + 1,65 * B - 2,19 * A^2 - 1,81 * B^2 + 0,45 * A * B$$

A otimização realizada a partir dos dados experimentais visou minimizar o teor de hidróxido de sódio empregado no pré-tratamento, sem reduzir as taxas de produção de etanol. Esta otimização foi realizada através da função de Derringer & Suich ou função *Desirability* global (Derringer & Suich, 1980; Montgomery & Calado, 2003).

As condições consideradas, na minimização do teor de NaOH, foram: concentração de etanol acima de 50 g/L e relação sólido:líquido dentro da faixa avaliada (1:10 até 1:20). A Figura

5.6 apresenta a superfície de resposta gerada pelo modelo na minimização do teor de hidróxido de sódio.

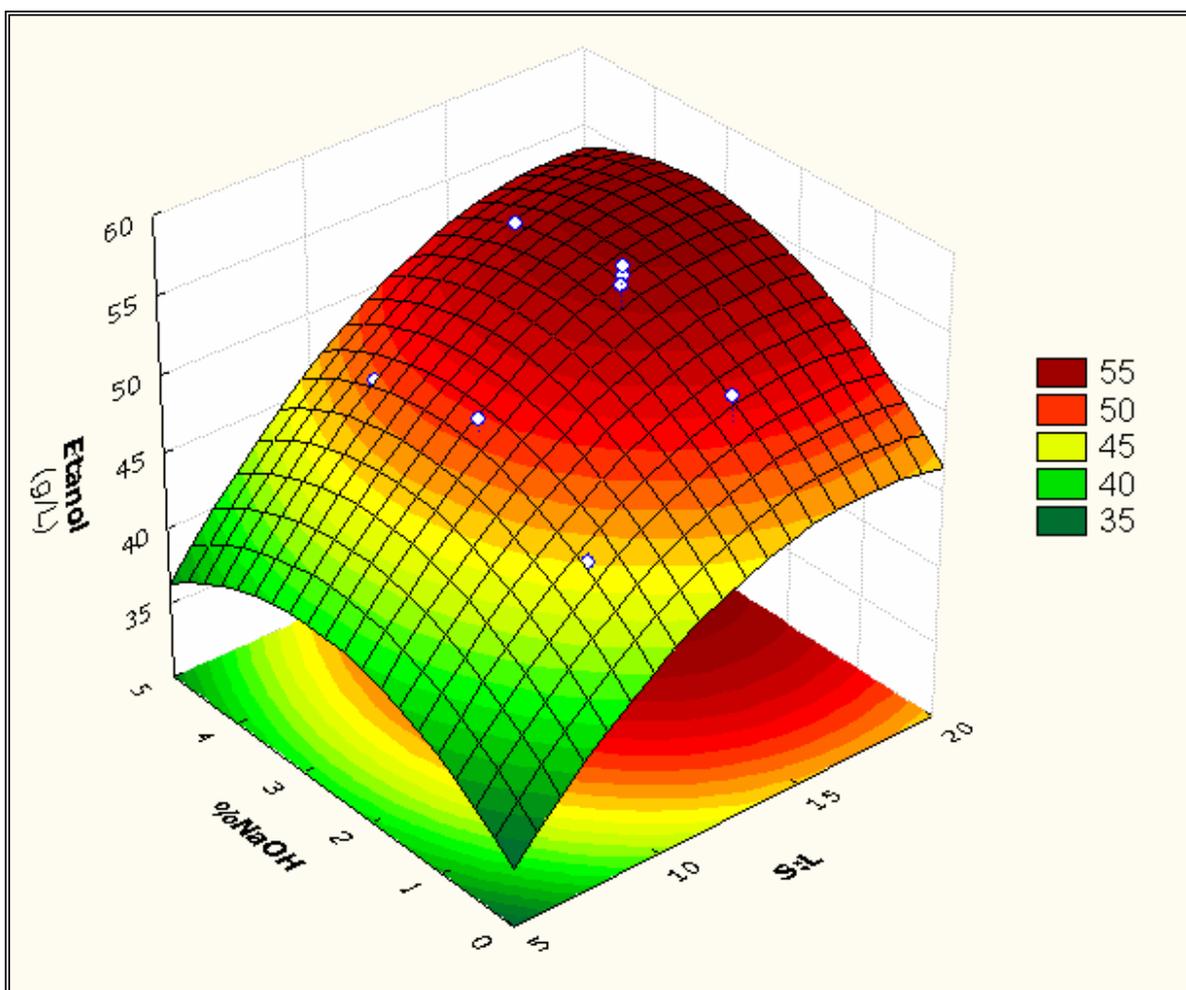


Figura 5.6: Superfície de resposta correspondente à função *desirability*.

Na superfície de resposta, os valores que atendem as condições dadas para minimizar o teor de hidróxido de sódio, encontram-se dentro da área vermelha, correspondente aos maiores valores de concentração de etanol.

O modelo quadrático prediz, 1% de hidróxido de sódio e relação sólido:líquido de 1:15 como as condições que

minimizaram a quantidade de hidróxido de sódio empregado na deslignificação, sem afetar as taxas de produção de etanol. O valor final da concentração de etanol predita pelo modelo foi de 51,21 g/L.

5.3. VALIDAÇÃO DA CONDIÇÃO ÓTIMA

Com o intuito de validar as condições ótimas preditas pelo modelo, foi realizado um experimento em biorreator com a *celulignina* pré-tratada com 1% de hidróxido de sódio e uma relação sólido:líquido de 1:15. O perfil cinético correspondente a este experimento encontra-se na Figura 5.7.

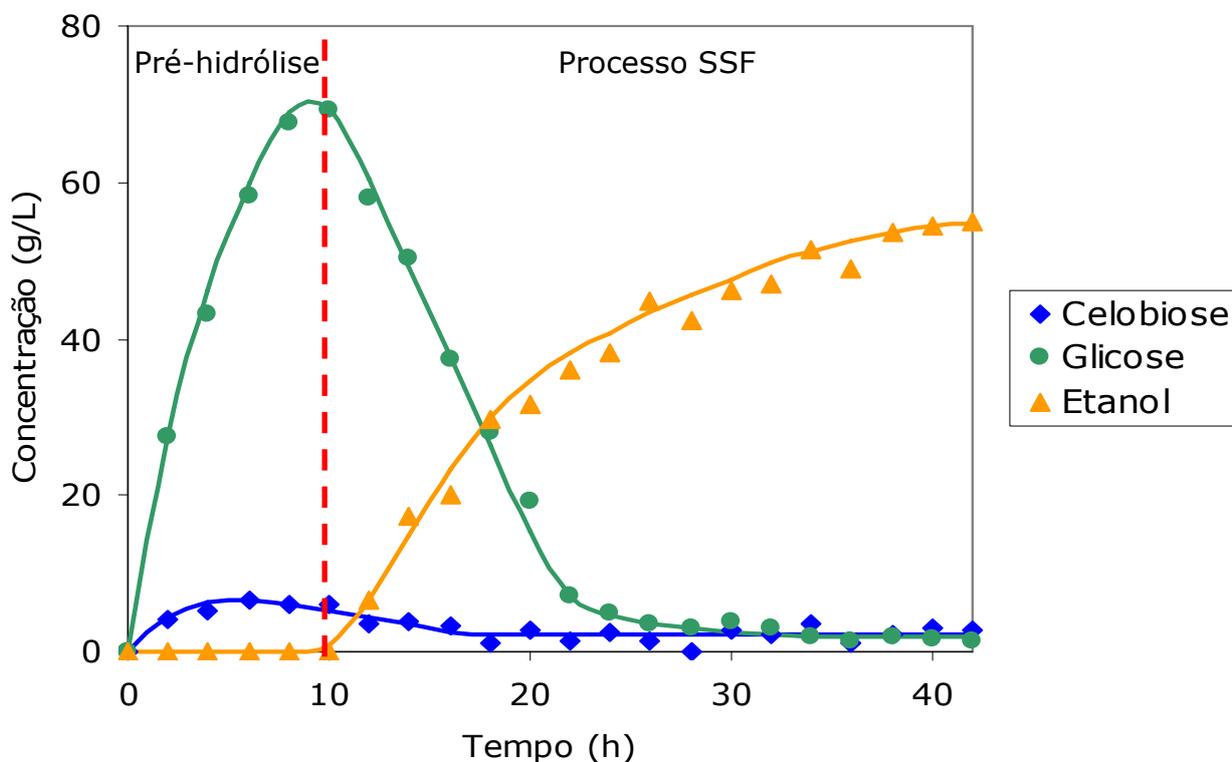


Figura 5.7: Perfis cinéticos da validação em biorreator.

Pode-se observar na Figura 5.7, que a concentração de celobiose começa a se estagnar após as 6 horas de pré-hidrólise enzimática. Ao atingir 10 horas de experimento, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é inoculada, iniciando o consumo da glicose no meio e permitindo a desinibição da enzima β -glicosidase. Isto também pode ser verificado pela diminuição da concentração da celobiose após a inoculação.

O perfil cinético (Figura 5.7) também permitiu visualizar que a concentração final de etanol, de 54,7 g/L, apresentou-se maior que o valor predito pelo modelo. Esta maior concentração de etanol pode ser justificada pelo sistema de controle mais eficiente, oferecido pelo biorreator, das variáveis envolvidas no processo (temperatura, pH, agitação).

5.4. AVALIAÇÃO ECONÔMICA DO ETANOL

O balanço de massa realizado por Schlittler (2006) reportou que para 1000 toneladas de bagaço de cana-de-açúcar utilizaram-se 220 toneladas de hidróxido de sódio e 7937 toneladas de água, aproximadamente. Com a redução de hidróxido de sódio de 4% para 1%, conseguiu-se diminuir 165 toneladas de hidróxido de sódio no processo. Em relação à água utilizada no pré-tratamento houve uma redução de 1460 toneladas com a relação sólido:líquido de 1:15, na qual anteriormente empregava-se uma relação de 1:20.

Na avaliação econômica deste processo criaram-se três cenários para analisar a viabilidade econômica deste processo (Schlittler, 2006). No primeiro cenário é implementada a condição autônoma, onde não há nenhuma interação com outros processos, de forma a

compartilhar facilidades comuns. O segundo cenário é dentro do contexto de unidades associadas. E no terceiro, a proposta foi reunir o contexto de unidades associadas com o que, atualmente, é denominado biorrefinaria.

As diminuições, correspondentes às reduções dos insumos, no custo total de hidróxido de sódio e água, no custo por litro de etanol e no preço do etanol estão apresentados nas Tabelas 5.3 e 5.4.

Tabela 5.3: Comparação entre os custos total e por litro de etanol para Schlittler (2006) e este trabalho.

Insumos	Schlittler (2006)		Este trabalho	
	Custo Total (US\$)	Custo/ L EtOH (US\$)	Custo Total (US\$)	Custo/ L EtOH (US\$)
NaOH	146.292,89	0,902	36.630,00	0,226
Água Proc.	63,49	0,000	51,81	0,000

Tabela 5.4: Comparação entre os preços finais do etanol para os diferentes cenários.

Cenário	Schlittler (2006) (US\$/L)	Este trabalho (US\$/L)
Primeiro	1,436	0,756
Segundo	1,158	0,471
Terceiro	0,279	-0,397

Pode-se perceber que a redução no preço do etanol foi significativa (Tabela 5.4), em todos os cenários apresentados, principalmente no terceiro cenário. Este cenário considera que os subprodutos são facilmente comercializados, sem avaliar os custos de recuperação,

fazendo este cenário ideal dentro do contexto atual. Mesmo assim, se fosse possível a realização deste cenário aplicando o conceito da biorrefinaria, os lucros obtidos na venda do etanol seriam de 100%, levando o preço da produção do etanol a zero (US\$ 0/L) e qualquer valor dado a este produto seria um ganho financeiro para a empresa.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSÕES

1. Através dos experimentos do planejamento fatorial foi possível confirmar a remoção de parte da lignina presente nas fibras de *celulignina* com o emprego dos pré-tratamentos, melhorando o acesso das enzimas do consórcio celulásico à celulose;
2. A partir da validação dos valores preditos pelo modelo, pode-se concluir que foi possível reduzir a quantidade de hidróxido de sódio empregada no pré-tratamento da *celulignina* de 4% para 1%, sem grandes impactos na taxa de produção de etanol.
3. A relação sólido:líquido foi aumentada de 1:20 para 1:15; o preço da água apresenta-se ínfimo, porém a economia gerada pela redução da relação sólido:líquido possui um sentido ecologicamente importante no cenário mundial;

4. A redução dos insumos utilizados neste processo permitiu que o preço do etanol se tornasse competitivo dentro do mercado em todos os cenários analisados, porém o cenário número três apresentou-se ideal frente aos outros;

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C.L. & MENEZES, T.J.B. (2002) Conversão Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, n. 26 Maio-Junho.

ANP - AGENCIA NACIONAL DO PETRÓLEO - (2004) Anuário estatístico do Ano 2004. Disponível em: www.anp.gov.br. Acesso: jun/2005.

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, A. *Trends in New Crops and New Uses*. Alexandria: ASHS Press.

BHAT, M.K. & BHAT, S. (1997) Cellulose Degrading Enzymes and their Potential Industrial Applications. *Biotechnology Advances*, v. 15, p. 583-620.

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.

CALADO, V. & MONTGOMERY, D. (2003) Planejamento de Experimentos Usando o Statistic. Editorial E-papers Serviços Editoriais, Rio de Janeiro. Brasil.

CARAMEZ, 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.

CRUEGER, W; CRUEGER, A. (1993). *Bioteconología: Manual de Microbiología Industrial*. Zaragoza: Editora Acribia, España, 3ª edição, p. 414.

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. & 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.

DERRINGER, G. & SUICH, R. (1980) *Journal of Quality Technology*, v. 12, n. 4, p. 214-219.

FAIRBANKS, M. (2003) Álcool: Tecnologia, Ampla Oferta e Reduz Custo do Álcool. *Química e Derivados*, n. 417. Disponível em: <http://www.quimica.com.br>. Acesso: jun./ 2007.

FERREIRA, O. C. (2002) Avaliação preliminar do potencial de produção de etanol da cana-de-açúcar. *Economia & Energia*, n. 34.

FONSECA, E.F.C. (2003) Estudos para a Otimização da Produção Enzimática de Sorbitol e Ácido Glicônico. Tese de Doutorado. Escola de Química. 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.

HENRISSAT, B. (1991) A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities. *Biochemical Journal*, v. 280, p. 309-316.

KLEMAN-LEYER, K.M. et al. (1996) The Cellulases Endoglucanase I and Cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* Act Sinergistically to Solubilize Native Cotton Cellulose but not to Decrease its Molecular Size. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 62, n. 8, p. 2883-2887.

LAMONICA, H. M. (2005) Geração de energia elétrica a partir da biomassa de cana; In: SEMINÁRIO BIOELETRICIDADE, 3. 2005, Rio de Janeiro. Anais eletrônicos. Rio de Janeiro: BNDES. Palestra. Disponível em: http://www.inee.org.br/down_loads/eventos/Geracao_EE_Biomassa_Cana_Lamonica_BNDES_2005.pdf. Acesso: julho/2007.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H. & DALE, B.E. (2005) Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121-124, p. 1081-1099.

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.

LYND, L.R. (1996) *Annu. Ver: Energy Envirom.* v. 21, p. 43-65.

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

LYND, L.R.; ZYL, W.H. V.; MCBRIDE, J. & LASER M. (2005) Consolidated Bioprocessing of Cellulosic Biomass: an Update. *Biotechnology*, v.16, p. 577–583.

MONTGOMERY, D.C. (2001) *Design and Analysis of Experiments*. Editorial Wiley. Quinta Ed.USA.

MOOR, R.; CLARK, D. & VODOPICH, D. (1998) *Botany Visual Resource Library*. The McGraw-Hill Companies, Inc. Unite State.

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.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B. & BRAUN R. (2002) Dilute-Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse at Varying Conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98-100, p. 49-58.

OLSSON, L. & HAHN-HÄGERDAL, B. (1996) Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates for Ethanol Production. *Enzyme Microbial Technology*, v. 18, p. 312 – 331.

OMETTO, J.G.S.; ARANTES, A.F.A.; MARANHÃO. J.C.; NETO, P.B.; BRITO, C.V. AVERHOFF, F.D.L.R.; NAVARRO Jr., L.;

NASTARI, P.M.N. (1985). Ethanol – The renewable & ecologically safe solution. 5-20. The Brazilian ethanol producer´s committee. Av. Paulista, 2028-6th floor/São Paulo-Brasil. CEP:01310

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.E. & SOCCOL, V.T. (2000a) Biotechnological Potential of Agro-industrial Residues I: Sugarcane Bagasse. Bioresource Technology, vol. 74, n. 1, p. 69-80.

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. (2006) Palestra II: Biotecnologia de Lignocelulósicos e o Contexto de Biorrefinaria Associado. XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ). 24-27 setembro de 2006.

PEREIRA, M.A. (2007) Energia Total da Cana. FAPESP. Disponível em: <http://www.agencia.fapesp.br/boletim>. Acessado: Agosto/2007.

RYU, D.D.Y.; LEE, S.B. (1992) Enzyme Engineering. New York: Plenum Press.

SANTOS, A. S. (2002). A participação brasileira aos movimentos internacionais de oposição ao MTBE. Economia & Energia. n. 31. Disponível em: http://ecen.com/eee31/merc_alcool.htm. Acessado: jun./2007.

SANTOS, A.S. (2000a). A experiência brasileira no desenvolvimento de um combustível binário álcool-diesel. *Economia & Energia*, n. 20. Disponível em: <http://www.ecen.com/eee20/adailson.htm>. Acessado: jun./2007.

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

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.S.; AQUARIBE, E. & BORZANI, W. (2001a) *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*, v. 2. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1 edição. 541 p.

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: julho/2007.

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>

SOMAVILLA, C. & GOMES NETO, E.H. (2005) Etanol e as Células Combustíveis. Brasil H2 Fuel Cell Energy. Disponível em: <http://www.celulaacombustivel.com.br>. Acessado: junho/2007.

SUN, Y. & CHENG, J. (2002) Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: a Review. *Bioresource Technology*, v. 83, n. 1, p. 1-11.

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.

UNICA (União de Agroindústria Canavieira de São Paulo) (2005). Dados históricos. Disponível em: <http://www.portalunica.com.br>. Acesso: junho/ 2007.

VÁSQUEZ, M.P. (2007) Desenvolvimento de Processo de Hidrólise Enzimática e Fermentação Simultânea para a Produção de Etanol a Partir de *Celulignina* de Bagaço de Cana de Açúcar. Exame de Qualificação. Tese de Dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Brasil.

VÁSQUEZ, M.P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA Jr., M.B. e PEREIRA Jr., N. (2006) Estudos Prévios Sobre a Hidrólise Enzimática da Celulignina ao Serem Empregados Diferentes Métodos de Deslignificação. XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Santos (Brasil).

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

ZHANG, Y.H.P. & LYND, L.R. (2004) Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 88, n. 7, p. 797-824.