Universidade Federal de Rio de Janeiro
Escola de Química
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE HIDROLISE ENZIMÁTICA E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Mariana Peñuela Vásquez

Orientadores: Nei Pereira Jr., *PhD.*
Mauricio Bezerra de Souza Jr., *DSc.*

2007

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE HIDROLISE ENZIMÁTICA E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

MARIANA PEÑUELA VÁSQUEZ

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (*DSc.*).

ESCOLA DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
OUTUBRO 2007

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE HIDROLISE ENZIMÁTICA E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

MARIANA PEÑUELA VÁSQUEZ

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (*DSc.*).

Aprovada por:

_____
Prof. Nei Pereira Jr., *PhD*.
(Orientador Presidente)

_____
Prof. Maurício Bezerra de Souza Jr., *DSc*.
(Orientador)

_____
Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres, *PhD*.

_____
Profa. Marisa Helena Cardoso, *DSc*.

_____
Profa. Mônica Caramez Triches Damaso, *DSc*.

_____
Profa. Eliana Mossé Alhadeff, *DSc*.

_____
Profa. Andréia Medeiros Salgado, *DSc*.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
OUTUBRO 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

VÁSQUEZ, MARIANA PEÑUELA
Desenvolvimento de Processo de Hidrólise Enzimática e Fermentação Simultâneas para a Produção de Etanol a Partir de Bagaço de Cana-de-Açúcar /Mariana Peñuela Vásquez. – Rio de Janeiro,
2007.
xxiv, 205 p, 29,7 cm.
Tese Doutorado (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2007.
Orientadores: Nei Pereira Jr., *PhD.*
Mauricio Bezerra de Souza Jr., *DSc.*
1. Etanol
2. Bagaço de Cana-de-Açúcar
3. Pré-Tratamento
4. Hidrólise Enzimática
5. Processos SSF
I. Pereira Jr., N. & Souza Jr., M.B.
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. Pós-graduação em Tecnologia de processos Químicos e Bioquímicos.

"Levante-se, seja valente e forte!! Saiba que você é quem cria seu próprio destino.
Toda força e toda ajuda que você necessita já existe dentro de você."
Swami Vivekananda

Caí, eles me levantaram.
Desequilibrei, eles me seguraram.
Precisei, eles deram um jeito.
Decidí, eles me apoiaram.
A minha família Alvaro, Luz Marina, Adrian e Roque,
que tudo merecem, dedico-lhes este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar a oportunidade de estar aqui, aprender e desenvolver esta pesquisa; abençoando-me com a capacidade necessária para enfrentar todos os obstáculos;

A minha família, da qual sempre tive apoio total e um amor incondicional;

Ao professor Nei Pereira Jr., por sua orientação, confiança, sabedoria, companheirismo, amizade e liderança;

Ao professor Mauricio Bezerra de Souza Jr. pela sabedoria, experiência, amizade e orientação concedidas; por ter aceitado o desafio de levar à Biotecnologia as ferramentas da estatística e a simulação;

A Gabriel Jaime Vargas Betancur, porque sem sua amizade, companhia, conhecimento, ajuda e, principalmente, sua paciência este trabalho não teria sido completado;

A Elisa Mara Prioli Ciapina e Vilmar Soares Rochedo por ser os meus anjos da guarda em todos os aspectos da minha vida ao longo do desenvolvimento desta Tese de Doutorado;

A Juliana Nascimento C. da Silva, pela contribuição ao desenvolvimento da pesquisa e que além de ter sido a minha aluna, converteu-se numa grande amiga, da qual hoje me sinto orgulhosa;

A Kelly Cristina N. R. Pedro, que com sua destreza na bancada e sua simpatia fez com que tudo o trabalho parecesse simples;

Ao meu amigo R. Nobuyuki Maeda pela sua colaboração, atenção e valiosa amizade desde a sua chegada.

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

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação da Escola de Química, por terem tornado fácil a realização de toda a burocracia envolvida no Mestrado e a minha permanência no Brasil,

À PETROBRAS e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE HIDROLISE ENZIMÁTICA E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo da Tese de *DSc* apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro - Brasil.

Mariana Peñuela Vásquez

Orientadores: Prof. Nei Pereira Jr., *PhD*.
Prof. Maurício Bezerra de Souza Jr., *DSc*.

O bagaço de cana-de-açúcar representa o principal material lignocelulósico em países tropicais, com alto conteúdo de carboidratos e baixo teor de lignina. No Brasil, a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é um dos mais importantes produtos agrícolas, gerando em um ano, após seu aproveitamento nas usinas, cerca de 91,8 milhões de toneladas de bagaço. Devido ao alto conteúdo de carboidratos, o bagaço de cana-de-açúcar pode ser empregado para a produção de etanol e/ou outros produtos, dentro do contexto de biorrefinaria. Os materiais lignocelulósicos contêm entre 55 e 75% (em peso seco) de carboidratos; o bagaço de cana-de-açúcar é composto de 38,1% celulose, 28,4% hemicelulose, 18,4% lignina e 15,1% proteínas e cinzas. A celulose é um biopolímero de glicose unidas por ligações β-(1,4), sendo composta por regiões amorfas e cristalinas. Para conseguir o fácil aceso até a celulose, por parte das enzimas celulolíticas, é necessário que o material lignocelulósico seja submetido a pré-tratamentos, muitos dos quais têm sido avaliados técnica e economicamente visando melhorar a hidrólise enzimática. Na conversão da celulose a açúcares fermentáveis é empregado um complexo enzimático denominado celulases. Este complexo é composto por 3 tipos de enzimas que atuam sinergicamente: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases

(glucoidrolase EC 3.2.1.74 e celobioidrolase EC 3.2.1.91) e β-glucosidases (EC 3.2.1.21). Freqüentemente, o custo do pré-tratamento e das enzimas empregadas na hidrólise enzimática são ainda o principal obstáculo econômico para a comercialização das tecnologias de conversão de biomassa. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo de sacarificação e fermentação simultâneas (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*, SSF), com a avaliação de diversos fatores que possuem um papel importante neste processo. Como resultados deste estudo foram obtidos: as condições ótimas na etapa de pré-hidrólise enzimática (47°C, 25,9 FPU/g de sólido); condições que indicaram o aumento da produtividade do processo SSF (teor de sólido 20%, 37°C, 2 g/L de células, uréia como a melhor e mais econômica fonte de nitrogênio e um tempo de pré-hidrólise de 10 horas); não foram encontradas diferenças entre a *celulignina* obtida na hidrólise ácida que empregou 3% H_2SO_4 e a que empregou 1% H_2SO_4, para a obtenção de etanol pelo processo SSF, além de não descobrir diferença no processo quando foram empregados diferentes tamanhos de partícula de *celulignina*. Encontrou-se uma mistura de enzimas celulolíticas que melhoraram a hidrólise enzimática do processo. A quantidade de NaOH e a relação sólido:líquido foram reduzidos na etapa de deslignificação, o que gerou uma diminuição nos custos do processo. Finalizando, incrementou-se o teor de sólido até 30% alcançando uma concentração final de etanol de 70 g/L.

DEVELOPMENT OF ENZIMATIC HYDROLYSIS AND SIMULTANEOUS FERMENTATION PROCESS FOR ETHANOL PRODUCTION FROM SUGARCANE BAGASSE

Abstract of the *DSc* Thesis presented to the Graduate Program on Chemical Technology and Biochemical Processes of the Federal University of Rio de Janeiro - Brazil.

By: Mariana Peñuela Vásquez

Advisor: Prof. Nei Pereira Jr., *PhD*.
Prof. Maurício Bezerra de Souza Jr., *DSc*.

Sugarcane bagasse represents the main lignocellulosic material to be considered by most of tropical countries, since it is readily available in the distilleries without additional cost and it has high carbohydrate and low lignin content. In Brazil, sugarcane (*Saccharum* spp.) is one of the most important agro-industries product; in one year, them produced, 91.8 millions tons of bagasse. Due to the high carbohydrate content, sugar cane bagasse can be potentially used for bioethanol production and/or others products, within of biorefinery concept. Lignocellulosic materials contain 55-75% carbohydrates in dry weight; sugarcane bagasse is composed of 38.1 wt% cellulose, 28.4 wt% hemicellulose, 18.4 wt% lignin and 15.1 wt% proteins and ashes. Cellulose is a biopolymer of β(1,4)-linked glucose dimmers (cellobiose), it is composed by crystalline and amorphous regions, which is easier degraded by enzymes than the crystalline component. The lignocellulosic biomass must be pretreated to make the cellulose fraction more accessible to enzymatic attack. Diverse pretreatment processes have been evaluated under technically and economical concepts aiming at improving enzymatic hydrolysis. Bioconversion of solid cellulose to easily fermentable stream of glucose monomers, an enzymatic complex should be used. The enzymatic complex is able to hydrolyze cellulose

to glucose molecules is called cellulases. Enzymatic complex is usually composed of three types of enzymes that act synergistically: endo-glucanases (EC 3.2.1.4), exo-glucanases (glucohydrolase EC 3.2.1.74 and celobiohydrolase EC 3.2.1.91) and β-glucosidases (EC 3.2.1.21). Currently, the costs of pretreatment and enzymes for cellulose hydrolysis are still the main economic obstacle to the commercialization of biomass bioconversion technologies. The aim of this work was to develop a *simultaneous saccharification and fermentation* (SSF) process, different factors that play an important role in the process were studied. As result were obtained the optimal conditions for enzymatic pre-hydrolysis (47°C, 25,9 FPU/g of solid), the better conditions for SSF process were found (Solid 20%, 37°C, 2 g/L of cells, urea as nitrogen source and 10 hour of enzymatic pre-hydrolysis), it did not find differences between *cellulignin* obtained with 3% and 1% of sulfuric acid (acid hydrolysis) in the SSF process and between particle size of *cellulignin* neither. An adequate cellulase enzymatic mixture was found to improve the enzymatic hydrolysis of the SSF process. It was reduced the NaOH percent and solid:liquid ratio used in the deslignification stage. To increase the solid percent still 30% the final ethanol concentration was improved.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 **1**
1. APRESENTAÇÃO DO TEMA DE TESE 1
1.1. INTRODUÇÃO 1
1.2. JUSTIFICATIVA 7
1.3. ARTIGOS E TRABALHOS COMPLETOS APRESENTADOS 8

CAPÍTULO 2 **10**
2. OBJETIVOS 10
2.1. OBJETIVO GERAL 10
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 10

CAPÍTULO 3 **12**
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 12
3.1. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO 14
3.1.1. Hemicelulose 19
3.1.2. Celulose 23
3.1.3. Lignina 30
3.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM CELULASES 33
3.3. FATORES QUE AFETAM A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA 38
3.4. ETANOL 41
3.4.1. PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL 43
3.4.2. APLICAÇÕES DO ETANOL 56
3.4.3. ETANOL NO CONTEXTO DA BIORREFINARIA 60
3.4.4. PRODUÇÃO DE ETANOL POR SSF NA LITERATURA 64

CAPÍTULO 4 **71**
4. MATERIAIS E MÉTODOS 71
4.1. MICRORGANISMO 71
4.2. MEIO DE MANUTENÇÃO 71
4.3. MEIO DE PRÉ-INÓCULO E INÓCULO 72
4.4. MATÉRIA-PRIMA 74
4.5. PROCESSOS DE DESLIGNIFICAÇÃO 74
4.6. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA 76
4.7. PREPARADOS ENZIMÁTICOS 76
4.8. PROCESSO SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) 77
4.9. AVALIAÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO E SAIS 78
4.10. ESTUDO DA ADIÇÃO DA ENZIMA β-GLUCOSIDASE NO PROCESSO SSF 79
4.11. OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO REALIZADO SOBRE A CELULIGNINA NO PROCESSO SSF 81
4.12. AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDO NO PROCESSO SSF 82
4.13. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM) 82
4.14. METODOLOGIA ANALÍTICA 83
4.14.1. Amostras 83
4.14.2. Quantificação Celular 84
4.14.3. Determinação de Metabólitos 84
4.14.4. Atividade Enzimática 86

CAPÍTULO 5 **87**
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 87
5.1. PROCESSOS DE DESLIGNIFICAÇÃO 87
5.1.1. PRÉ-TRATAMENTOS ALCALINOS 89
5.1.2. PRÉ-TRATAMENTOS ÁCIDOS 101

5.2. AVALIAÇÃO DOS PRÉ-TRATAMENTOS E DOS PREPARADOS ENZIMÁTICOS COMERCIAIS 105
5.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM) 111
5.4. ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA 114
5.5. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO PROCESSO SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) 131
5.6. AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DE CELULIGNINA OBTIDA NA HIDRÓLISE ÁCIDA COM 1% E 3% (v/v) DE ÁCIDO SULFÚRICO 147
5.7. SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO COM FONTES DE NITROGÊNIO E SAIS 149
5.8. INFLUÊNCIA DO TAMANHO DE PARTÍCULA NO PROCESSO SSF 152
5.9. COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO, COMO INÓCULO NO PROCESSO SSF, DA LEVEDURA COMERCIAL PRENSADA E A LEVEDURA ISOLADA E PROPAGADA PREVIAMENTE 154
5.10. ESTUDO DA ADIÇÃO DA ENZIMA β-GLUCOSIDASE NO PROCESSO SSF 155
5.11. OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO REALIZADO SOBRE A CELULIGNINA NO PROCESSO SSF 164
5.12. AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDO NO PROCESSO SSF 177

CAPÍTULO 6 181
6.1. CONCLUSÕES 181
6.2. SUGESTÕES 186

CAPÍTULO 7 187
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 187

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 3.1. Diagrama Esquemático dos Processos de Conversão Energética da Biomassa (Aneel, 2005) 13
Figura 3.2. Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico (Lee, 1997) 15
Figura 3.3. Evolução da produção de bagaço no Brasil (UNICA, 2007) 18
Figura 3.4. Estruturas químicas dos monômeros constitutivos da hemicelulose (D'Almeida, 1988) 20
Figura 3.5. Estrutura típica da hemicelulose (Mussatto, 2002) 21
Figura 3.6. Segmentos típicos de xilanas em angiospermas e gimnospermas (D'Almeida, 1988) 22
Figura 3.7. Fibras de celulose na parede das células Vegetais (Moor *et al.*, 1998) 24
Figura 3.8. Estrutura simplificada da celulose (Pereira Jr., 1991) 25
Figura 3.9. Hidrólise química da celulose em meio ácido **(a)** e em meio alcalino **(b)** (D´Almeida, 1988) 28
Figura 3.10: Precursores primários da lignina 31
Figura 3.11. Atuação sinérgica das enzimas do complexo Celulásico (Rad & Yazdanparast 1998) 37
Figura 3.12. Distribuição mundial da produção de etanol (Renewable Fuels Association, 2007) 42
Figura 3.13. Produção tradicional de etanol (Adaptado de Pereira Jr., 1991) 45
Figura 3.14. Diagrama de blocos do processo SHF-1 (Wingren *et al* 2003) 50
Figura 3.15. Diagrama de blocos do processo SHF-2 (Wingren *et al.* 2003) 50
Figura 3.16. Diagrama de blocos do processo SSF 52

Figura 3.17. Esquema do processo SSF em Biorreator 53
Figura 3.18. Diagrama de blocos do processo SSCF 54
Figura 3.19. Diagrama de blocos do processo CBP-1 55
Figura 3.20. Diagrama de blocos do processo CBP-2 56
Figura 3.21. Aplicações do Etanol 58

Figura 4.1. Representação esquemática do tratamento das amostras 83
Figura 4.2. Regressão linear e coeficiente de correlação para a quantificação de biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*, λ = 570 nm 84
Figura 4.3. Cromatograma da solução padrão pico de celobiose: 10,75 min, pico de glicose: 12,90 mim, pico de etanol 17,75 min) 85

Figura 5.1. Lavagem de *celulignina* com solução alcalina 89
Figura 5.2. Espectros de absorvância para os diferentes pré-tratamentos alcalinos em uma etapa 91
Figura 5.3. CL – *Celulignina*; **(a)** Resíduo sólido do pré-tratamento com NaOH 0,1M; **(b)** Resíduo sólido do pré-tratamento com NaOH 0,5M; **(c**) Resíduo sólido do pré-tratamento com NaOH 1M 91
Figura 5.4. Amostras da fração líquida de cada etapa do pré-tratamento para diferentes concentrações de NaOH e seus correspondentes espectros de absorvância para cada lavagem da seqüência; **(a)** NaOH = 1M **(b)** NaOH = 0,5M e **(c)** NaOH = 0,1M 94
Figura 5.5. CL – *Celulignina*; **(a)** Resíduo sólido do pré-tratamento seqüencial com NaOH 0,1M; **(b)** Resíduo sólido do pré-tratamento seqüencial com NaOH 0,5M; **(c)** Resíduo sólido do pré-tratamento seqüencial com NaOH 1M 96

Figura 5.6. (a) Resíduo sólido do pré-tratamento com NaOH 0,1M a 70°C por 20 min.; **(b)** Resíduo líquido; **(c)** Espectro de absorvância 97
Figura 5.7. (a) Resíduo sólido do pré-tratamento com NaOH 0,5M a 70°C por 20 min.; **(b)** Resíduo líquido; **(c)** Espectro de absorvância 98
Figura 5.8. (a) Resíduo líquido do pré-tratamento com NaOH 4% (m/v); **(b)** Espectro de absorvância 99
Figura 5.9. (a) Resíduo líquido do pré-tratamento álcool-alcalino; **(b)** Espectro de absorvância 100
Figura 5.10. (a) Resíduo líquido do pré-tratamento alcalino em 9 etapas; **(b)** Espectro de absorvância 101
Figura 5.11. (a) Sistema de extração utilizado para o processo de solvatação **(b)** sobrenadante do processo de filtração 102
Figura 5.12. Espectro de absorvância do líquido extraído pelo processo de solvatação 103
Figura 5.13. Sólido e líquido resultante do segundo tratamento ácido residual na *celulignina* 104
Figura 5.14. Sólido e líquido resultante do segundo tratamento térmico com ácido residual na *celulignina* 105
Figura 5.15. Curvas de progresso utilizando como substrato a *celulignina* sem pré-tratamento com os diferentes consórcios enzimáticos comerciais e igual carga enzimática (15FPU/g) 106
Figura 5.16. Concentrações de glicose após 24 **(a)** e 48 **(b)** horas de hidrólise enzimática com o complexo **Spezyme®CP** (*Genencor International*), em condições de hidrólise de 50°C, pH 4,8, 20 FPU/g *celulignina* tratada e uma relação sólido:líquido 1:15. 108
Figura 5.17. Concentrações de glicose após 24 **(a)** e 48 **(b)** horas de hidrólise enzimática com o complexo **GC 220** (*Genencor*

International), em condições de hidrólise de 50°C, pH 4,8, 20 FPU/g *celulignina* tratada e uma relação sólido:líquido 1:15. 109

Figura 5.18. Concentrações de glicose após 24 **(a)** e 48 **(b)** horas de hidrólise enzimática com o complexo **Celluclast 1.5L FG** (*Novozymes*), em condições de hidrólise de 50°C, pH 4,8, 20 FPU/g *celulignina* tratada e uma relação sólido:líquido 1:15. 110

Figura 5.19. (a) Microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar **(b)** Microscopia eletrônica de varredura da *celulignina* 112

Figura 5.20. Microscopia eletrônica de varredura **(a)** bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, **(b)** *celulignina*, **(c)** resíduo sólido oriundo do pré-tratamento "G", **(d)** resíduo sólido oriundo do pré-tratamento "K" 113

Figura 5.21. Microscopia eletrônica de varredura dos resíduos do processo SSF (fundos de fermentação e leveduras) 114

Figura 5.22. Gráfico de Pareto para a conversão da *celuligninaG* em glicose (g glicose/g *celuligninaG*) 119

Figura 5.23. Gráfico de Pareto para a concentração de glicose (g glicose/L) 122

Figura 5.24. Superfície de resposta correspondente à função *Desirability global* 128

Figura 5.25. Cinéticas de fermentação do hidrolisado obtido nas condições preditas para **(a)** alta concentração de glicose; **(b)** para função *Desirability* e **(c)** para alta conversão a glicose 131

Figura 5.26. Gráfico de Pareto para concentração de etanol como variável de resposta (g/L) 133

Figura 5.27. Superfícies de Resposta, **(a)** % Sólido vs Tempo de Hidrólise Enzimática; **(b)** Concentração de Inóculo vs %Sólido; **(c)** Tempo de Hidrólise Enzimática vs Concentração de Inóculo 135

Figura 5.28. Perfis cinéticos para o processo SSF. Processos realizados com um teor de sólidos de **(a)** 10% (m/v) e **(b)** de 20%(m/v) 138
Figura 5.29. Perfis cinéticos para o processo SSF. Processos realizados com inóculo **(a)** de 2g/L e **(b)** de 6g/L 140
Figura 5.30. Gráfico de Pareto para a variável de resposta concentração de etanol (g/L) 142
Figura 5.31. Superfícies de Resposta, **(a)** Concentração de inóculo vs %Sólido (m/v); **(b)** % Sólido (m/v) vs Tempo de hidrólise enzimática 144
Figura 5.32. Cinética do processo SSF nas condições indicadas pelo planejamento experimental 146
Figura 5.33. Perfis cinéticos do processo SSF para avaliação do processo SSF com a *celulignina* resultante da hidrólise com ácido sulfúrico 1% e 3% (v/v) 149
Figura 5.34. Avaliação das fontes de nitrogênio e sais no processo SSF com *celulignina* proveniente da hidrólise ácida com H_2SO_4 3% (v/v) 150
Figura 5.35. Avaliação das fontes de nitrogênio e sais no processo SSF com *celulignina* proveniente da hidrólise ácida com H_2SO_4 1% (v/v) 152
Figura 5.36. Perfis cinéticos do processo SSF na avaliação de diferentes tamanhos de partícula do substrato sólido 153
Figura 5.37. Perfis cinéticos do processo SSF na avaliação de levedura comercial *Fleischmann* prensada ou cultivada como inóculo 155
Figura 5.38. Gráfico de Pareto para o efeito da adição de β-glucosidase sobre a variável de resposta "Concentração de Etanol (g/L)" 157

Figura 5.39. Superfície do Modelo Proposto para adição de β-glucosidase 159

Figura 5.40. Perfis cinéticos para o processo SSF para processos realizados **(a)** sem e **(b)** com adição de β-glucosidase 161
Figura 5.41. Perfil cinético da validação das condições preditas pelo modelo para a adição de β-glucosidase ao processo SSF 162
Figura 5.42. a. Comparação do perfil de celobiose no processo SSF com e sem β-glucosidase **b.** Comparação do perfil da glicose na pré-hidrólise enzimática com e sem β-glucosidase 163
Figura 5.43. Participação de cada grupo no balanço energético (Schlittler, 2006) 166
Figura 5.44. Gráfico de Pareto para otimização de NaOH na deslignificação 169
Figura 5.45. Perfis do processo SSF com *celulignina* pré-tratada com diferentes % de NaOH e relações sólido:líquido **a.** %NaOH = 1%**,** S:L = 1:10, 1:15 e 1:20 **b.** %NaOH = 2,5%, S:L = 1:10, 1:15 e 1:20 **c.** %NaOH = 4%, S:L = 1:10, 1:15 e 1:20 172
Figura 5.46. Superfície de resposta para minimizar a porcentagem de NaOH no processo de deslignificação 173
Figura 5.47. Cinética do processo SSF utilizando sólido obtido nas condições de minimização de NaOH no processo de deslignificação (%NaOH = 1%, S:L = 1:14,7); teor de sólido = 20%, carga enzimática = 26 FPU/g 175
Figura 5.48. Cinética do processo SSF para um teor de sólido de 30% 178

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 3.1. Composição de diferentes tipos de resíduos agro-industriais (Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996; Lee, 1997) 15
Tabela 3.2. Constituintes básicos de alguns materiais Lignicelulósicos (Lee, 1997) 16
Tabela 3.3. Quantidade relativa de diferentes estruturas na hemicelulose de folhosas e coníferas (D'Almeida, 1988) 19
Tabela 3.4. Propriedades de algumas fontes celulósicas (Zhang & Lynd, 2004) 26
Tabela 3.5. Diferenças entre hemicelulose e celulose (Pereira Jr., 2001) 29
Tabela 3.6. Características físico-químicas do etanol 42
Tabela 3.7. Resumo de condições empregadas para a hidrólise enzimática na literatura 65
Tabela 3.8. Resumo de condições empregadas para o processo SSF para produção de etanol na literatura 68

Tabela 4.1. Composição do meio de manutenção 72
Tabela 4.2. Composição do meio de inóculo 72
Tabela 4.3. Composição da solução de sais e ácido cítrico 73
Tabela 4.4. Processos de deslignificação aplicados sobre a *celulignina* 75
Tabela 4.5. Intervalos utilizados para construir o planejamento experimental (3^4) para a otimização da hidrólise enzimática. 76
Tabela 4.6. Intervalos utilizados para construir o planejamento experimental (2^3) para o processo SSF. 78

Tabela 4.7. Suplementação do meio de cultura no processo SSF 79
Tabela 4.8. Matriz do Planejamento Fatorial para Adição de β-glucosidase (2^2) 80
Tabela 4.9. Matriz do Planejamento para minimização do NaOH na deslignificação 81
Tabela 4.10. Condições operacionais do cromatógrafo 85

Tabela 5.1. Planejamento Fatorial Completo 3^4 (4 Fatores, 3 Níveis) 115
Tabela 5.2. Concentração final de glicose e conversão a glicose em cada uma das combinações do planejamento experimental utilizando o consórcio enzimático GC220 116
Tabela 5.3. Análise de variância (ANOVA) para a conversão da *celulignina* em glicose (g glicose/g *celuligninaG*) R^2 = 0,88 120
Tabela 5.4. Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose (g glicose/L). R^2 = 0,914 123
Tabela 5.5. Coeficientes dos modelos da equação quadrática de otimização 125
Tabela 5.6. Valores ótimos preditos pelos modelos estatísticos e valores obtidos na validação experimental 127
Tabela 5.7. Planejamento fatorial completo (2^3) 132
Tabela 5.8. Análise de variância (Tabela de ANOVA) para concentração de etanol variável de resposta (g/L) 134
Tabela 5.9. Planejamento Fatorial Completo (3 Fatores, 2 Níveis) 136
Tabela 5.10. Análise de variância (Tabela de ANOVA) 143
Tabela 5.11. Resultados da avaliação de *celulignina* obtida com 1% (v/v) e 3% (v/v) de ácido sulfúrico 148
Tabela 5.12. Resultados da avaliação de fonte de nitrogênio e sais para dois tipos de *celulignina* 150
Tabela 5.13. Resultados da avaliação de diferentes tamanhos de

partícula do substrato sólido 153
Tabela 5.14. Resultados da avaliação de levedura comercial *Fleischmann* como inóculo 154
Tabela 5.15. Planejamento Fatorial Completo para Adição de β-glucosidase (2 Fatores, 2 Níveis) 156
Tabela 5.16. Análise de variância para adição de β-glucosidase (Tabela de ANOVA) 158
Tabela 5.17. Valores que sinalizam a adição de β-glucosidase e a diminuição do consórcio GC220 160
Tabela 5.18. Demanda mássica diária dos insumos do processo (Schlittler, 2006) 165
Tabela 5.19. Quantidade de resíduos produzidos (Schlittler, 2006) 166
Tabela 5.20. Matriz experimental para minimização do NaOH na deslignificação 168
Tabela 5.21. Análise de variância (Tabela de ANOVA) para minimização do NaOH na deslignificação 170
Tabela 5.22. Valores que minimizam a porcentagem de NaOH no processo de deslignificação 174
Tabela 5.23. Comparação entre os custos por litro de etanol para Schlittler (2006) e os da otimização de insumos para a deslignificação 176
Tabela 5.24: Comparação entre os preços finais do etanol para os diferentes cenários. 176

CAPÍTULO 1

1. APRESENTAÇÃO DO TEMA DE TESE

1.1. INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de hidrocarbonetos para o desenvolvimento industrial, além de ocasionar uma diminuição das reservas de petróleo e um aumento excessivo dos preços de seus derivados, tem gerado altos índices de contaminação ambiental. Estes fatores têm motivado a humanidade a procurar novas alternativas energéticas e industriais nas quais diferentes derivados de petróleo sejam substituídos, possibilitando conseqüentemente, uma redução nos danos ocasionados ao meio ambiente. Uma razão que torna o petróleo difícil de ser substituído é que, sem sombra de dúvida, é a principal fonte de energia no mundo, fornecendo mais de 36% das necessidades energéticas; sendo, também vital como matéria-prima da indústria petroquímica (MAST, 2005).

Em princípio, outros combustíveis fósseis, como o gás natural e o carvão mineral, têm reservas significativas para substituir o petróleo. Porém, estas fontes são de difícil transformação em matéria-prima para a indústria química e não iriam resolver o outro grande problema relacionado ao petróleo: o impacto ambiental devido à formação de CO_2, CO e gases sulfurados e nitrogenados oriundos da sua queima ou transformação. Entre estes combustíveis, o gás natural seria a fonte mais promissora, com maior capacidade de expansão e mais "limpa", mas apresenta uma distribuição espacial não homogênea, demandando grandes investimentos em infra-estrutura e acordos internacionais complexos (Schuchardt & Ribeiro, 2000; MAPA, 2005).

Ampliar a oferta de energia, promovendo o desenvolvimento com impacto ambiental reduzido e preservando as fontes energéticas, é o maior desafio da comunidade científica na atualidade. O conceito de energia alternativa, intensamente investigada no século passado, hoje é sinônimo de energia renovável (Tidei, 2002).

As energias renováveis têm o potencial técnico de atender grande parte da crescente demanda energética mundial, independente da sua origem. Existem três aspectos importantes a ressaltar ao respeito das energias renováveis: a viabilidade econômica, a sustentabilidade de cada fonte e a disponibilidade destes recursos para a geração de energia, os quais variam entre as diferentes regiões do globo. No caso das biomassas, poucos países dispõem de condições de ampliar a área de agricultura energética, sem competir com outros usos da terra, como alimentação, lazer, moradia, vias de transporte e reservas de proteção ambiental (MAPA, 2005; Lal, 2005).

O Brasil apresenta muitas vantagens em relação aos outros países no que diz respeito ao uso de energia renovável. A primeira vantagem comparativa que se destaca é a perspectiva de incorporação de áreas à agricultura de energia, sem competição com a agricultura de alimentos, e com impactos ambientais

circunscritos ao socialmente aceito. O segundo aspecto a considerar é que a possibilidade de múltiplos cultivos dentro do ano calendário; o sistema de safra e safrinha, ou de cultivo de inverno e duplo cultivo de verão, já é uma tendência dominante na produção de grãos no país. Por situar-se, predominantemente, na faixa tropical e subtropical do planeta, o Brasil recebe intensa radiação solar ao longo do ano, o que promove uma maior densidade, por unidade de área, da produção de bioenergia (Pereira, 2006).

Para um país tropical como o Brasil, a exuberância da sua biodiversidade dá ao país a opção de novas alternativas energéticas associadas às biomassas, substitutos naturais para o petróleo. Biomassas são definidas como toda matéria orgânica renovável, incluindo matéria vegetal, quer seja cultivada em terra ou em água; produtos animais e esterco; subprodutos de processamento de alimentos e da silvicultura e resíduos urbanos. Tais materiais podem ser obtidos estabelecendo plantações de cultivos para bioenergia ou da origem nos resíduos da lavoura. O Brasil reúne condições para ser o principal receptor de recursos de investimento provenientes do mercado de carbono, no segmento de produção e uso de bioenergia (Schuchardt & Ribeiro, 2000; Lal, 2005).

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

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. Esse conceito baseia-se na utilização de resíduos agro-industriais,

principalmente materiais lignocelulósicos, como matéria-prima para a obtenção de vários produtos, destacando-se os biocombustíveis.

Entre os biocombustíveis destaca-se o etanol como substituto da gasolina no setor do transporte. No Brasil, um dos maiores produtores mundiais junto com os Estados Unidos, o etanol é produzido a partir de matéria-prima sacarínea, o caldo de cana, em um processo que se caracteriza pelo seu baixo custo. Nos Estados Unidos a produção de etanol é feita a partir do milho, sendo necessária a inclusão de uma etapa de hidrólise do material amiláceo, resultando em um custo de produção mais elevado do que o do etanol produzido no Brasil. Em ambos os casos, um aumento na produção, visando suprir a crescente demanda mundial pelo etanol, obrigaria a ampliação das áreas de cultivo.

Para evitar a expansão desmedida de cultivos para a produção de etanol, diminuir a quantidade de resíduos já produzidos e oferecer novas alternativas tecnológicas, as pesquisas atuais sinalizam a necessidade do desenvolvimento de processos, de base biotecnológica, que permitam à 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 o potencial suficiente para se tornarem matéria-prima para a produção de etanol.

Os materiais lignocelulósicos são constituídos por duas frações polissacarídicas (celulose e hemicelulose) e lignina. As frações polissacarídicas constituem de 50 a 70% do material, sendo majoritária a celulose (40-60%). Dentro do conceito de biorrefinaria, as frações devem ser separadas seletivamente de acordo com suas características e as do produto desejado, sendo necessário desenvolver processos eficientes para disponibilizar os monômeros (açúcares) e para a transformação destes através de processos de fermentação com altas taxas de produção.

No caso da utilização da celulose contida no material lignocelulósico, existem diferentes etapas críticas no processo. Inicialmente, se faz necessário o pré-tratamento do material para reduzir a cristalinidade da estrutura celulósica e para a remoção de outras frações. Posteriormente, devem ser utilizadas enzimas específicas para a hidrólise das cadeias glicosídicas em sinergia com o processo de fermentação da glicose, o qual se denomina *"Simultaneous Saccharification and Fermentation"* (SSF).

No presente estudo pretende-se desenvolver um processo SSF para o aproveitamento da celulose, contida no resíduo sólido proveniente da hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar, para a produção de etanol combustível. A tese está dividida em 6 capítulos, assim descritos:

No capítulo 1 situa-se o leitor acerca da importância do etanol como combustível renovável no contexto nacional e internacional, dando algumas das justificativas mais importantes para a realização desta tese.

O capítulo 2 descreve cada um dos objetivos específicos que foram cumpridos para alcançar o objetivo geral que se resume em desenvolver um processo SSF para converter as fibras de celulose, contidas na matriz lignocelulósica do bagaço de cana-de-açúcar, em etanol combustível.

O capítulo 3 traz uma revisão bibliográfica dos aspectos mais relevantes do processo SSF e dos materiais empregados dentro deste processo: as frações que compõem os resíduos lignocelulósicos, especificamente o bagaço de cana-de-açúcar; as enzimas envolvidas no processo de hidrólise da celulose e finalmente o etanol, sua importância no mercado, seus principais usos industriais e as perspectivas dos processos que estão sendo e serão desenvolvidos.

No capítulo 4 encontram-se descritas as metodologias empregadas ao longo do estudo. Os procedimentos analíticos e estatísticos, para alcançar os objetivos propostos, são detalhados.

O capítulo 5 apresenta os resultados obtidos no decorrer do trabalho, são discutidos os fenômenos biológicos, químicos e é realizada uma análise estatística e fenomenológica dos planejamentos experimentais propostos para a elaboração de alguns ensaios.

No capítulo 6 encontram-se as conclusões resultantes das análises dos resultados obtidos em cada um dos estudos realizados ao longo desta pesquisa.

Finalizando, o anexo apresenta as publicações realizadas no decorrer da tese, artigos e trabalhos completos em revistas e anais de congressos nacionais e internacionais.

1.2. JUSTIFICATIVA

A biomassa (primária e residual) será, em um futuro muito próximo, a principal fonte de recursos para a obtenção de produtos químicos e combustíveis. Neste contexto, os materiais lignocelulósicos ocupam um lugar importante, principalmente em função da sua abundância e do seu caráter renovável, fatores que têm propiciado um grande interesse por este tipo de material. Os resíduos lignocelulósicos caracterizam-se pelo seu baixo conteúdo de proteínas e baixa digestibilidade, o que dificulta a sua utilização como alimento animal no seu estado original. Por este motivo, a aplicação de tratamentos prévios, que permitam aumentar a digestibilidade e o valor nutritivo dos resíduos lignicelulósicos, é absolutamente essencial. A maior dificuldade para o aproveitamento desses resíduos reside na barreira física formada pela lignina e a cristalinidade da celulose, que impedem o aproveitamento da celulose nativa. Vários tipos de pré-tratamentos podem ser aplicados com o objetivo de diminuir o teor de lignina e facilitar a posterior hidrólise enzimática por celulases.

No Brasil utiliza-se o caldo extraído da cana-de-açúcar como matéria-prima para produção do biocombustível, gerando grandes quantidades de material lignocelulósico. O bagaço de cana-de-açúcar pode ser utilizado para a produção de etanol, caso sejam desenvolvidos processos que permitam a extração dos açúcares constituintes das porções polissacarídicas, sem a produção de substâncias tóxicas. Com a implementação deste tipo de processo, algumas estimativas estabelecem que a produção de etanol no Brasil poderia ser duplicada, sem a necessidade de aumentar as áreas de cultivo da cana-de-açúcar (Salomão & Onaga, 2006; Pereira Jr. 2006).

Neste panorama, faz-se evidente a importância do desenvolvimento de processos de produção de etanol, a partir do bagaço de cana, que envolvam baixos custos e altas produtividades, seguindo as atuais tendências da Biotecnologia. É neste contexto que esta pesquisa de doutorado se propõe, visando desenvolver um bioprocesso para a produção de etanol a partir da *celulignina*. A *celulignina* é o resíduo proveniente da hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar, na qual é extraída a fração hemicelulósica. Este resíduo possui um alto conteúdo de celulose que pode ser hidrolisada enzimaticamente para a produção de glicose que, posteriormente transformada, por via fermentativa, a etanol pelo processo SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*). Com isto, pretende-se colaborar e dar continuidade aos trabalhos desenvolvidos nesta temática nos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

1.3. ARTIGOS E TRABALHOS COMPLETOS APRESENTADOS

A seguir, estão apresentados os trabalhos que foram publicados em revistas indexadas e anais de congressos nacionais e internacionais baseados nos trabalhos realizados no desenvolvimento da Tese de Doutorado:

MARIANA PEÑUELA VÁSQUEZ; JULIANA NASCIMENTO C. DA SILVA; MAURÍCIO BEZERRA DE SOUZA Jr.; NEI PEREIRA Jr. (2007) Enzymatic Hydrolysis Optimization to Ethanol Production by *Simultaneous Saccharification and Fermentation*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 137-140, issues 12, p.141-154.

PEREIRA Jr., N.; SANTA ANNA, L. M. M.; GOMES, A. C. & **VÁSQUEZ, M. P.** (2006). Processo para a Produção de Etanol a partir de Materiais Lignocelulósicos por Via Enzimática (**Patente em período de sigilo**).

M. P. VASQUEZ, G. J. VARGAS, J. N. SILVA, P. G. MELO; M. B. SOUZA Jr., N. PEREIRA Jr. (2006) Evaluación del Potencial Biotecnológico del Follaje de Caña de Azúcar para la Producción de Etanol. Interamerican Congress Chemical Engineering. Buenos Aires (Argentina).

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

GABRIEL J. VARGAS BETANCUR, **MARIANA PEÑUELA VÁSQUEZ** & NEI PEREIRA Jr. (2005) Advances in Biotechnological Conversion Of Hemicellulosic Hydrolysate to Ethanol by *P. stipitis*: Optimization of the Hydrolyses Condition and Investigation of its Fermentability. Jornadas Iberoamericanas de Asimilación de Tecnologías para la Producción de Bioetanol y el Uso de sus Residuales Ponencias Sobre Aspectos Tecnológicos. Agencia Española de Cooperación Internacional, Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Cartagena (Colombia).

CAPÍTULO 2

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Esta tese de doutorado tem como objetivo a produção de etanol carburante empregando uma concepção de processo denominado SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) a partir da celulose contida na *celulignina*, resíduo sólido proveniente do tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar, estabelecendo condições que obedeçam a critérios de alta produtividade e de eficiência.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar diferentes metodologias de deslignificação e selecionar aquela que melhor se adeqüe à hidrólise enzimática.

- ✓ Avaliar o comportamento de diferentes consórcios celulásicos comerciais sobre a hidrólise da celulose contida na *celulignina*.

- ✓ Realizar um estudo do efeito de diferentes fatores que influenciem a hidrólise enzimática, como a temperatura, o pH, o teor de sólido e a carga enzimática; assim como a influência que possuem suas interações sobre o processo.

- ✓ Estudar os fatores e as interações que influenciem o desempenho do processo SSF. Fatores como temperatura, concentração do inóculo, tempo de pré-hidrólise enzimática, teor de sólido, fontes de nitrogênio.

- ✓ Avaliar a influência da enzima β-glucosidase na pré-hidrólise e no processo SSF na produção de etanol.

- ✓ Reduzir o teor de hidróxido de sódio empregado no processo de deslignificação.

- ✓ Maximizar a concentração de etanol utilizando-se os fatores de maior significância estatística no processo SSF.

CAPÍTULO 3

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

São visíveis os investimentos efetuados em diversas partes do planeta visando as inovações tecnológicas para o aproveitamento da bioenergia, sendo a produção de etanol um dos exemplos de maior sucesso.

Sistemas de gaseificação de biomassa acoplados a turbinas a gás para geração de eletricidade, turbinas de ciclo combinado gás/vapor, cama de circulação fluidizada (produção de gás combustível aquecido que pode ser aproveitado para geração de energia), gaseificação integrada de ciclos combinados (processo de gaseificação em que o gás combustível sintético de médio poder calorífico produzido é queimado em turbinas a gás, onde o calor residual dos gases de exaustão pode ser recuperado e aproveitado por meio de uma turbina a vapor), cogeração (processo de produção simultânea de energia mecânica ou elétrica e térmica que permite a otimização e o acréscimo de eficiência nos sistemas de conversão e utilização de energia), tecnologia de aproveitamento de óleos vegetais como biocombustíveis (biodiesel),

produção de etanol e metanol de celulose, desenvolvimento de combustíveis, além de melhoria de processos de produção, colheita, armazenagem, transporte e processamento de biomassa, são alguns exemplos de inovações tecnológicas (MAPA, 2005).

A Figura 3.1 apresenta um diagrama esquemático dos processos de conversão energética da biomassa.

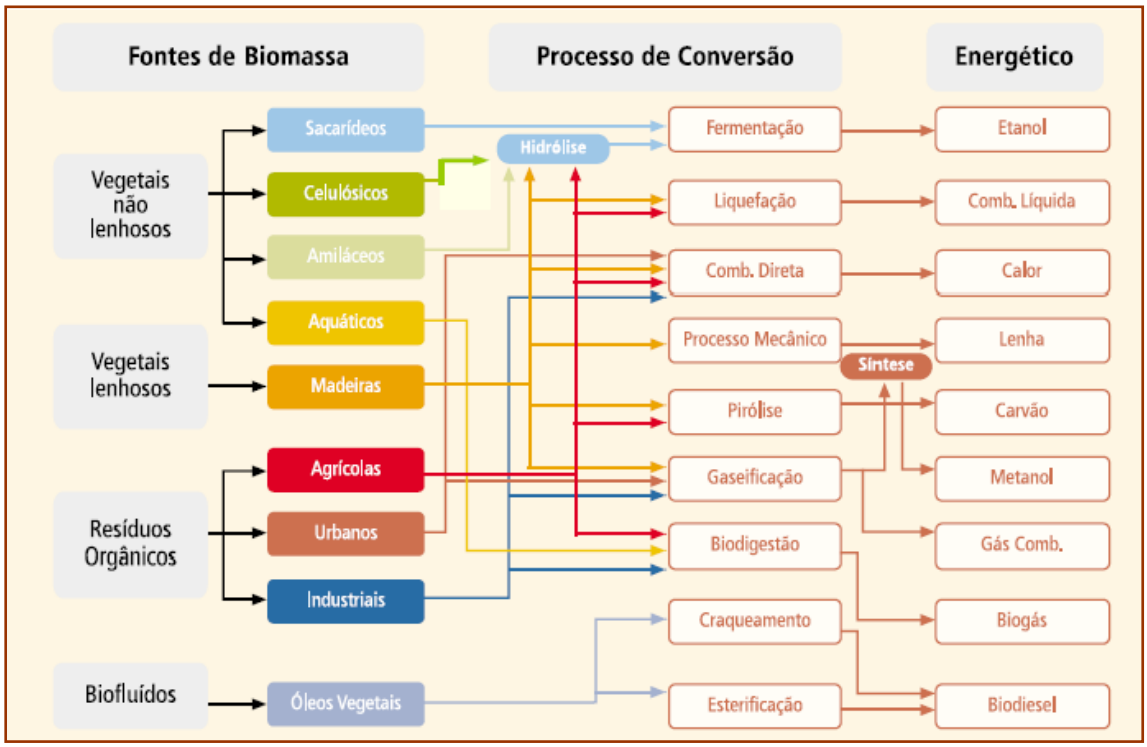


Figura 3.1. Diagrama Esquemático dos Processos de Conversão Energética da Biomassa (ANEEL, 2005)

Apesar de a maioria dos biocombustíveis ainda ser mais cara do que os combustíveis fósseis, a sua utilização está crescendo em vários países do mundo. Encorajada por decisões políticas, a produção de

biocombustíveis a nível mundial é atualmente estimada em mais de 35 bilhões de litros (COM, 2006).

O Brasil acumulou portentosa experiência no desenvolvimento de uma pujante agroindústria, em que um dos paradigmas é justamente a agroindústria de etanol, reconhecida como a mais eficiente do mundo em termos de tecnologia de processo e de gestão. A experiência dos últimos 30 anos forjou competência de gestão e negociação na cadeia, gerando as condições para uma nova investida em outros nichos do mercado da agricultura de energia (MAPA, 2005; NAE, 2005).

3.1. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

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. Os materiais lignocelulósicos 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, conforme ilustrado na Figura 3.2 (Lee, 1997). 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; Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996, Neureiter *et al.*, 2002).

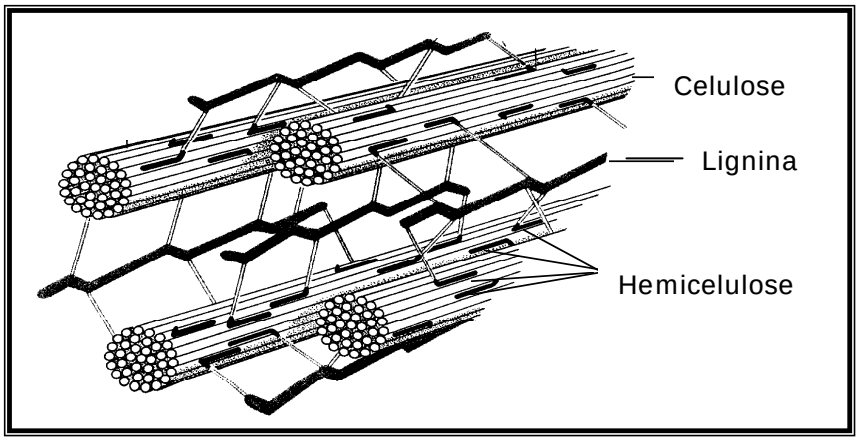


Figura 3.2. Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico (Lee, 1997)

A composição básica do material lignocelulósico depende do vegetal de origem, da espécie da planta, da região de cultivo, idade e período do ano em que se realiza a colheita do material, dentre outros fatores que a influenciam (Hassuani, 2005). A Tabela 3.1 ilustra algumas fontes de material lignocelulósico e sua composição básica aproximada (porcentagem das frações celulósica, hemicelulósica e lignina).

Tabela 3.1. Composição de diferentes tipos de resíduos agro-industriais (Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996; Lee, 1997)

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

Igualmente, a composição em glicídeos da celulose e da hemicelulose, mostrada na Tabela 3.2, apresenta variações segundo o tipo de material lignocelulósico, sendo esses açúcares o verdadeiro objeto de interesse para a produção de diferentes substâncias por via biotecnológica

Tabela 3.2. Constituintes básicos de alguns materiais lignicelulósicos (Lee, 1997)

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

n.d. – medidas não determinadas

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo lignocelulósico, proveniente da indústria sucro-alcooleira. Segundo Lamonica (2005), assim como a palha, o bagaço compõe, em média, 28% do peso da cana de açúcar, ou seja, a cada 1 tonelada de cana processada, 280 kg de bagaço de cana com 50% de umidade são gerados. 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).

Durante muito tempo, no Brasil, o bagaço foi considerado um resíduo industrial, sendo fundamentalmente utilizado nas caldeiras das usinas,

gerando calor para a produção de vapor, energia mecânica ou energia elétrica em processos de pouca eficiência, devido à inexistência de aplicações mais atraentes para o material. A utilização deste resíduo contribuiu para o desenvolvimento do parque sucro-alcooleiro nacional, já que confere auto-sustentabilidade energética para as usinas e destilarias. Apesar dessa aplicação, entre 10% e 15% do bagaço não possui uma destinação apropriada tornando-se poluente (Fairbanks, 2003; Pandey *et al.*, 2000). Nos últimos anos a produção do bagaço de cana-de-açúcar tem tido um aumento significativo devido à forte demanda por etanol combustível. A Figura 3.3 apresenta o aumento progressivo da produção de bagaço no Brasil entre os anos de 1970 e 2002, a expectativa é que essa produção aumente ainda mais nos anos futuros.

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 uma alta eficiência da extração dos glicídios, baixa degradação dos açúcares e diminuição na produção de inibidores (Sun & Cheng, 2002).

Atualmente existe um aumento na disponibilidade do bagaço de cana-de-açúcar devido à integração energética das usinas. Esta integração energética consiste no uso de material vegetal seco para produzir energia o que inclui caldeiras mais eficientes (já existentes) e à substituição de parte do bagaço queimado por outros materiais como

palha, o que está gerando um excedente de bagaço próximo aos 78% do bagaço obtido no processo de extração do melaço de cana-de-açúcar (UNICA, 2007).

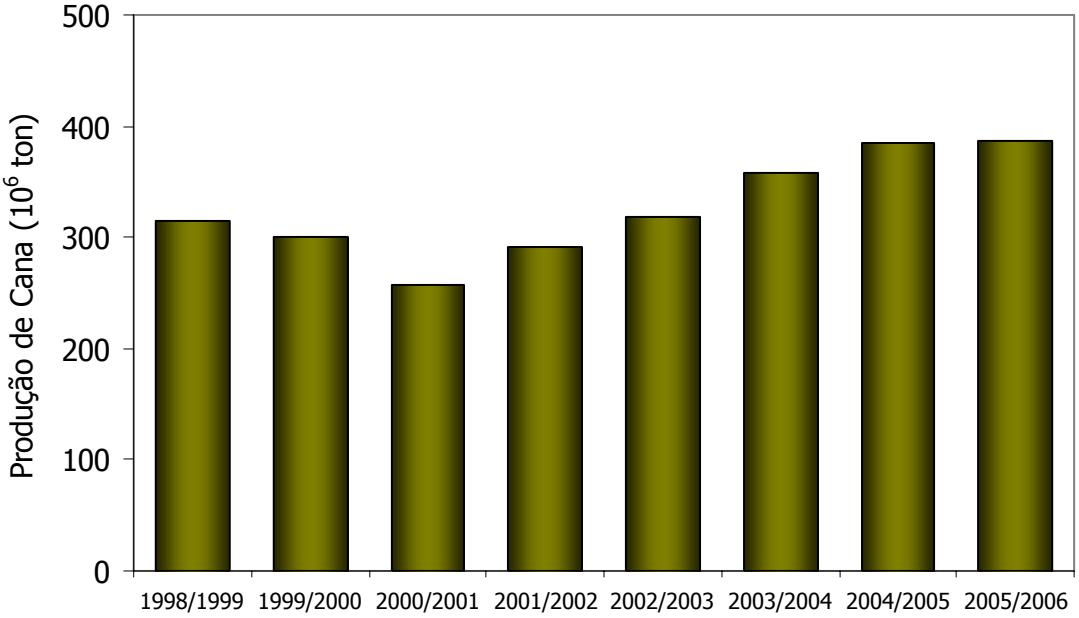


Figura 3.3. Evolução da produção de bagaço no Brasil (UNICA, 2007)

Com o aumento da quantidade de excedente de bagaço e a existência de processos mais eficientes para a extração de glicídios, o bagaço poderia ser destinado a etapas de pré-tratamento e posterior transformação em substâncias de maior interesse, aumentando a produtividade das indústrias, sem acréscimos nas áreas de plantio. No caso brasileiro, estima-se que o bagaço excedente, se fosse utilizado na produção de etanol, permitiria duplicar a produção deste combustível no país sem aumentar as áreas de plantio (Betancur, 2005; Prereira Jr., 2006).

3.1.1. Hemicelulose

A hemicelulose é uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular que estão intimamente associados com a celulose nos tecidos das plantas. A hemicelulose é um polímero, em cuja composição podem aparecer, condensadas em proporções variadas, as seguintes unidades de açúcar: β-D-xilose, β-D-manose, β-D-glicose, α-L-arabinose, α-D-galactose, ácido β-D-glucurônico, ácido β-D-galacturônico e ácido α-D-4-O-metilglucurônico, dependendo da origem da matéria prima (Fonseca, 2003; Delgenes *et* al., 1988). A Figura 3.4 representa os esquemas das estruturas químicas dos componentes hemicelulósicos.

Nos polímeros hemicelulósicos existem pelo menos dois tipos de unidades de açúcar. As hemiceluloses isoladas das madeiras são misturas complexas de polissacarídeos, sendo os mais importantes glucuranoxilanas, arabinoglucuranoxilanas, glucomananas, arabinogalactanas e galactoglucomananas. A Tabela 3.3 apresenta a quantidade relativa destes polímeros presentes em madeiras de coníferas e folhosas (D´Almeida, 1988).

Tabela 3.3. Quantidade relativa de diferentes estruturas na hemicelulose de folhosas e coníferas
(D'Almeida, 1988)

HEMICELULOSES	Ocorrência em	
	Folhosas	*Coníferas*
Glucouranoxilanas	20-25%	Traços
Arabinoglucouranoxilanas	Traços	10-14%
Glucomananas	2-5%	12-20%
Galactoglucomananas	2-5%	12-20%
Arabinogalactanas	1-2%	~2%

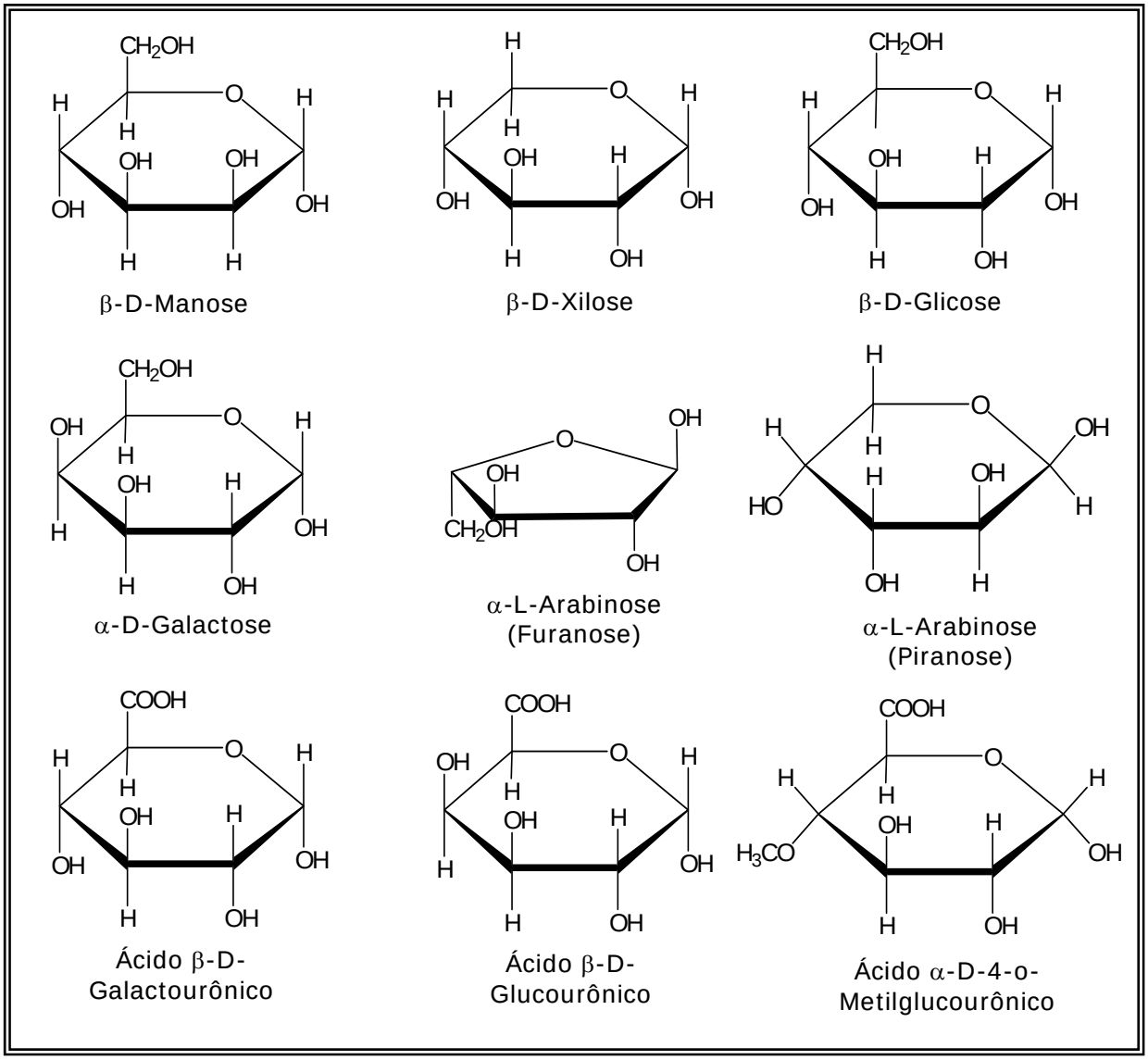


Figura 3.4. Estruturas químicas dos monômeros constitutivos da hemicelulose. (D'Almeida, 1988)

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. Como no caso da celulose e da lignina, o teor e a proporção dos diferentes componentes encontrados nas hemiceluloses da madeira variam grandemente entre diferentes espécies e, provavelmente, também indivíduos da mesma espécie

(D'Almeida, 1988). A Figura 3.5 ilustra uma estrutura típica de hemicelulose.

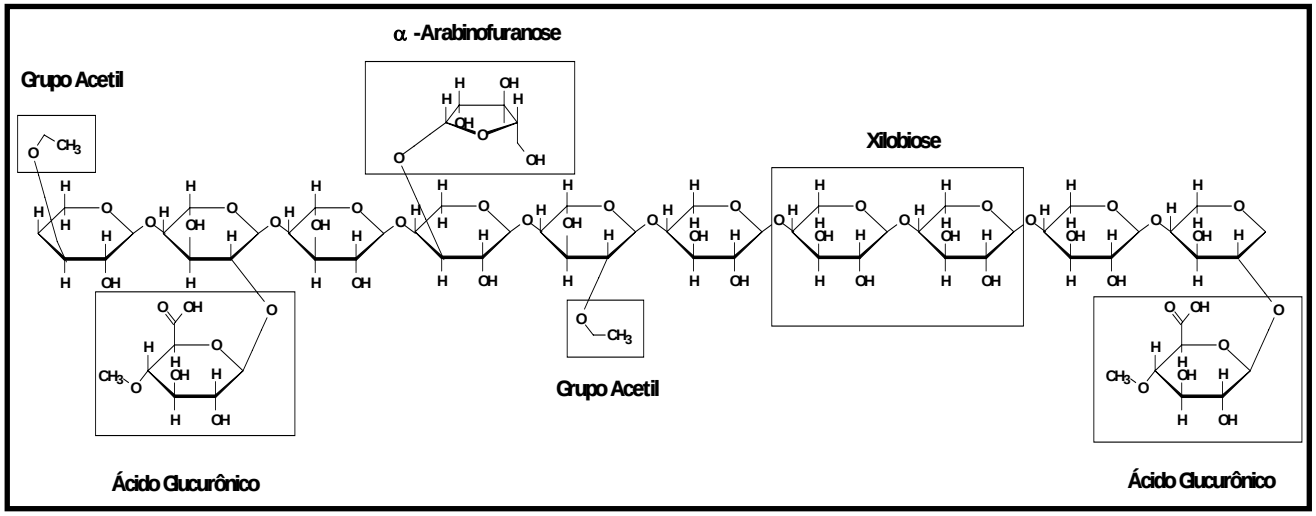
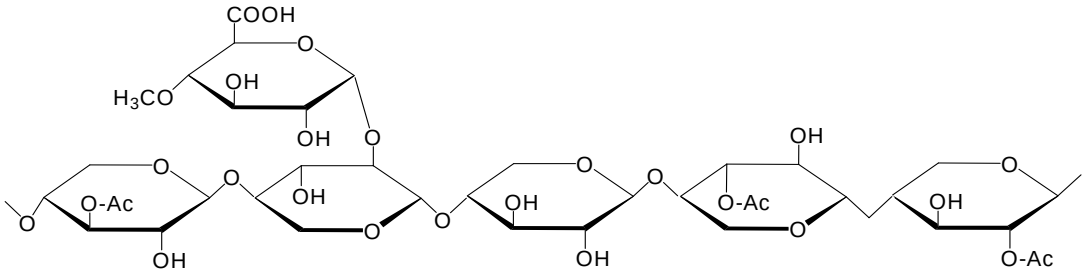


Figura 3.5. Estrutura típica da hemicelulose
(Mussatto, 2002)

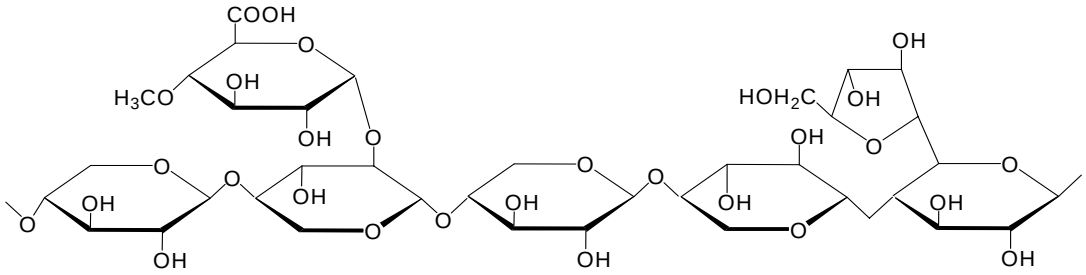
Além das madeiras, os resíduos agroindustriais constituem uma fonte abundante de material lignocelulósico, principalmente em países agrícolas como o Brasil. Um excelente exemplo disto é o resíduo das indústrias sucro-alcoleiras. O bagaço de cana de açúcar possui um alto conteúdo de xilana no complexo hemicelulósico, a qual representa entre 20 a 35% da massa seca deste ao complexo, tornando-o uma significativa fonte de biomassa renovável (Caramez, 1999).

Xilanas: são polissacarídeos com estrutura linear formada por unidades de xilose unidas entre si por ligações β-1,4. As xilanas de gimnospermas diferem das angiospermas pela ausência de grupos acetila e pela presença de unidades de arabinofuranose unidas à estrutura de

xilanas por ligações glicosídicas α-1,3. A Figura 3.6 mostra segmentos das duas espécies de xilanas.



Segmento da 0-acetil-4-0-metilglucouranoxilana de angiospermas



Segmento da arabino-4-0-metilglucouranoxilana de gimnospermas

Figura 3.6. Segmentos típicos de xilanas em angiospermas e gimnospermas (D'Almeida, 1988)

<u>Mananas</u>: são polissacarídeos de estrutura lineares formados por unidades de manose e glicose ligadas por enlaces β-1,4; são chamadas também de glucomananas. As glucomananas das angiospermas são cadeias pouco ramificadas com um grau polimerização de 60 a 70 com

uma proporção de duas unidades de manose por cada unidade glicose. Já para gimnospermas esta relação é de 3:1 e é caracterizada por apresentar grupos acetil e galactose ligados à cadeia principal.

Galactanas: são polímeros ramificados e solúveis em água. As galactanas possuem uma estrutura linear de unidades de galactose unidas por ligações β-1,3 e cadeias laterais de galactose ou de galactose-arabinose ou de arabinose ou de ácidos glucourônicos, unidos à cadeia principal por ligações β-1,6.

3.1.2. Celulose

A celulose é um monopolímero orgânico encontrado freqüentemente na natureza, compõe a maior parte da parede celular dos vegetais, constituindo-se em seu elemento estrutural mais importante (Lemos, 2001). É um homopolissacarídeo formado por unidades de β-D-glicose, unidas por ligações glucosídicas β(1-4) carbono-carbono e por ligações de hidrogênio, dando origem a um polímero linear (Figura 3.7). A celobiose, duas unidades de glicose unidas por ligações β(1-4), é a unidade de repetição do biopolímero de celulose.

O tamanho da molécula varia dependendo da fonte de celulose, mas geralmente tem entre 8000 e 14000 unidades de glicose, apresentando uma massa molecular de cerca de 2,3 milhões de unidades de massa atômica (Shleser, 1994).

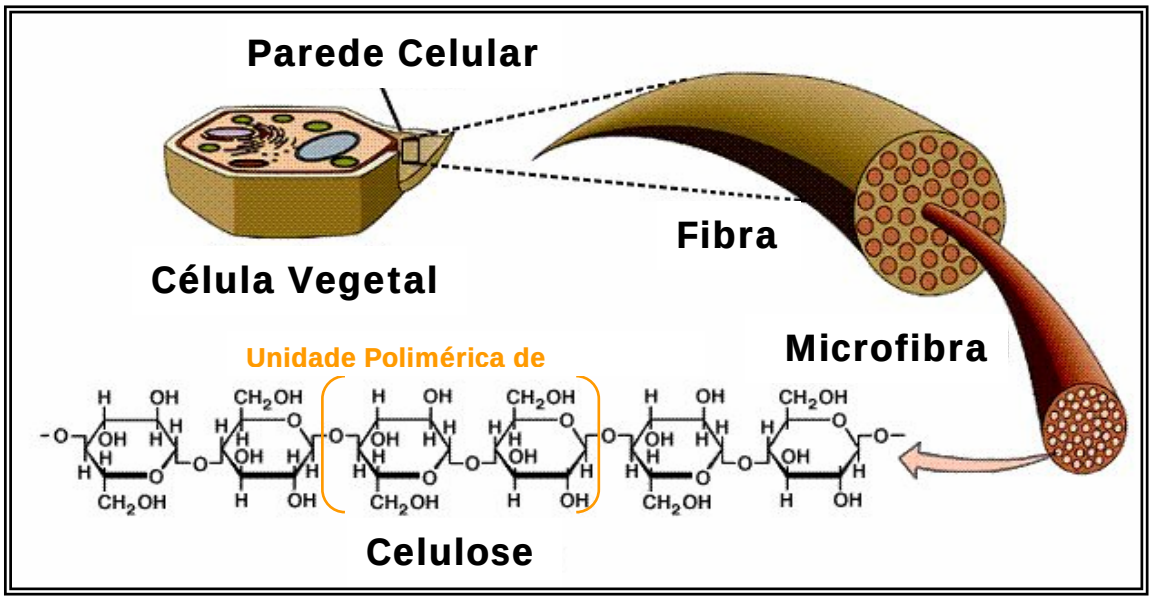


Figura 3.7. Fibras de celulose na parede das células vegetais (Moor *et al.*, 1998)

As moléculas de celulose tendem a formar ligações hidrogênio intramoleculares (ligações entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes) como está ilustrado na Figura 3.8. As ligações intermoleculares nas cadeias lineares são responsáveis pela rigidez; e as ligações intramoleculares são responsáveis pela formação da fibra vegetal; isto é, as moléculas de celulose se alinham, formando as microfibrilas, as quais formam as fibrilas que, por sua vez, se ordenam para formar as sucessivas paredes celulares da fibra.

A dificuldade em hidrolisar a molécula de celulose nativa tem sido o maior desafio para a utilização de materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas. A molécula é resistente à hidrólise pela sua estrutura cristalina altamente organizada, e pela barreira física de lignina que circunda as fibras de celulose. No entanto, existem regiões amorfas, nas quais as moléculas não são tão ordenadas, sendo mais suscetíveis à hidrólise (Lemos, 2001).

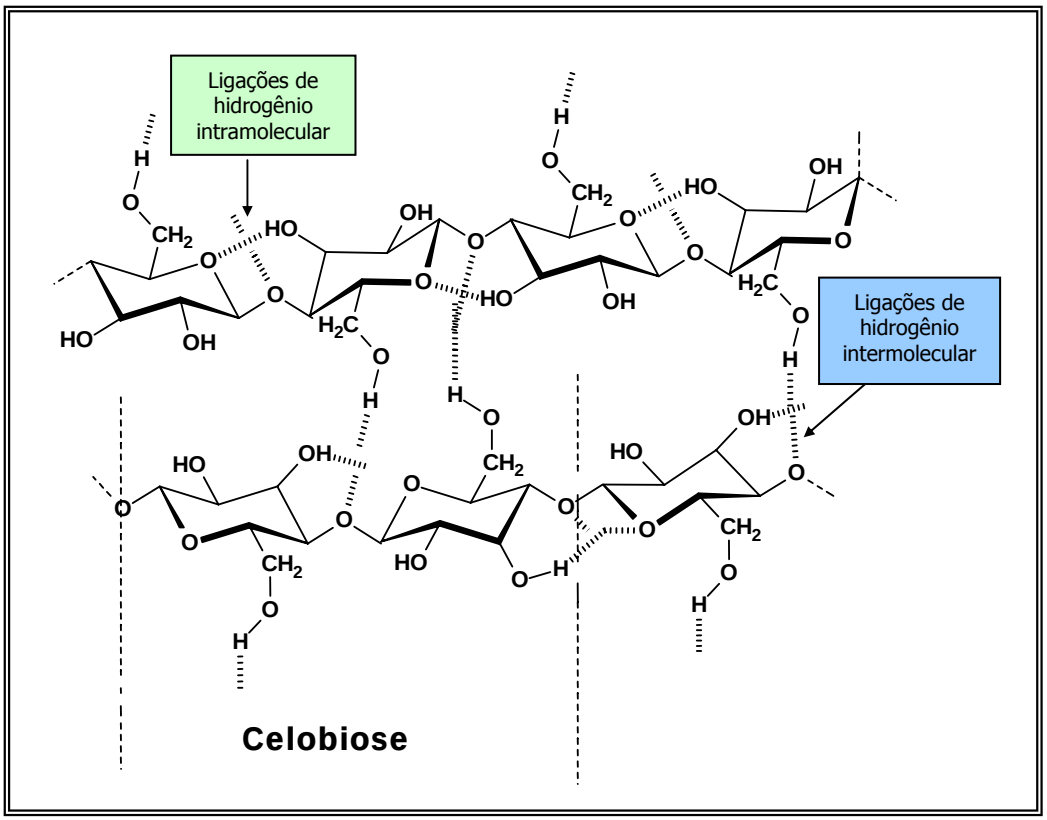


Figura 3.8. Estrutura simplificada da celulose (Pereira Jr., 1991)

As análise de raios X mostram que as fibras são constituídas de regiões cristalinas (moléculas altamente ordenadas) e amorfas (moléculas desordenadas). As regiões ordenadas são conhecidas como microcristalitos, cristalitos, e micelas. Na região cristalina, as fibras têm maior resistência à tração, ao alongamento, e à solvatação (absorção de solvente). A resistência à tração na região cristalina é 15 vezes o valor apresentado na região amorfa, onde a fibra possui sua maior flexibilidade. O grau de cristalinidade da celulose pode ser determinado, além de difração de raios X, por infravermelho ou por acessibilidade química (D´Almeida, 1988).

Duas importantes propriedades que ajudam na diferenciação e classificação dos polímeros celulósicos são: o grau de polimerização (GP)

e o índice de cristalinidade (IC). O GP informa a freqüência relativa de ligações glicosídicas internas e terminais, disponíveis para atuação de endo e exo enzimas, respectivamente. Pode ser definido com base no número médio de monômeros e no peso médio do polímero, assim como inferido a partir de sua viscosidade. Já o IC está associado à reatividade do substrato, e pode ser quantificado pela técnica de difração de raios-X, utilizando-se equações intrínsecas ao tipo de celulose avaliada (Sun *et al.*, 2004).

A Tabela 3.4 apresenta valores de GP (baseados na quantidade de unidades monoméricas) e IC para alguns tipos de celulose. Observa-se que pré-tratamentos impostos ao polímero natural resultam, geralmente, em reduções nos valores de IC e GP, como é o caso da celulose tratada com ácido fosfórico, que apresenta valor de IC típico de estrutura amorfa. Moléculas com degradabilidade potencial (DP) menor que 6 são solúveis em solução aquosa, enquanto que as com DP entre 6 e 14 são levemente solúveis (Zhang & Lynd, 2004).

Tabela 3.4. 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.

A celulose pode sofrer diferentes tipos de degradação, entendendo-se por degradação a clivagem da ligação β(1,4)-glucosídica da molécula de celulose. A degradação produz moléculas com grau de polimerização menor, afetando as propriedades físico-químicas que dependem do comprimento da cadeia, tais como a viscosidade e a resistência mecânica. Os diferentes tipos de degradação sofridos pela celulose podem ser distinguidos assim:

Degradação Química: este tipo de degradação pode ocorrer em meio ácido ou alcalino. Em meio ácido a degradação é dependente do pH, e se a concentração do ácido for alta, a taxa de degradação é apreciável, mesmo em temperaturas inferiores a 100°C (Figura 3.9a). Na análise de material lignicelulósico em laboratório, o procedimento consiste em uma hidrólise total da celulose com ácido sulfúrico concentrado, seguido de um tratamento com ácido quente diluído, a fim de hidrolisar os produtos de reversão que resultam da hidrólise primária total. Em meio básico, essa degradação ocorre essencialmente de duas maneiras:

a) temperatura maior de 150°C e concentrações elevadas de álcalis (Figura 3.9b);

b) em temperaturas acima de 70°C, o ataque é realizado na unidade final redutora da molécula de celulose e resulta na retirada de uma molécula de glicose na forma de ácido sacarínico sendo esta reação denominada *peeling*. A taxa de degradação não é considerável na ausência de grupos eletrófilos (grupos que atraem elétrons). Quando a celulose não é solúvel no meio de reação, é realizada uma degradação heterogênea, na qual a celulose mantém a estrutura fibrosa e o ataque é realizado nas regiões amorfas, o que representa uma fração entre 10-12 % em massa da celulose (D´Almeida, 1988).

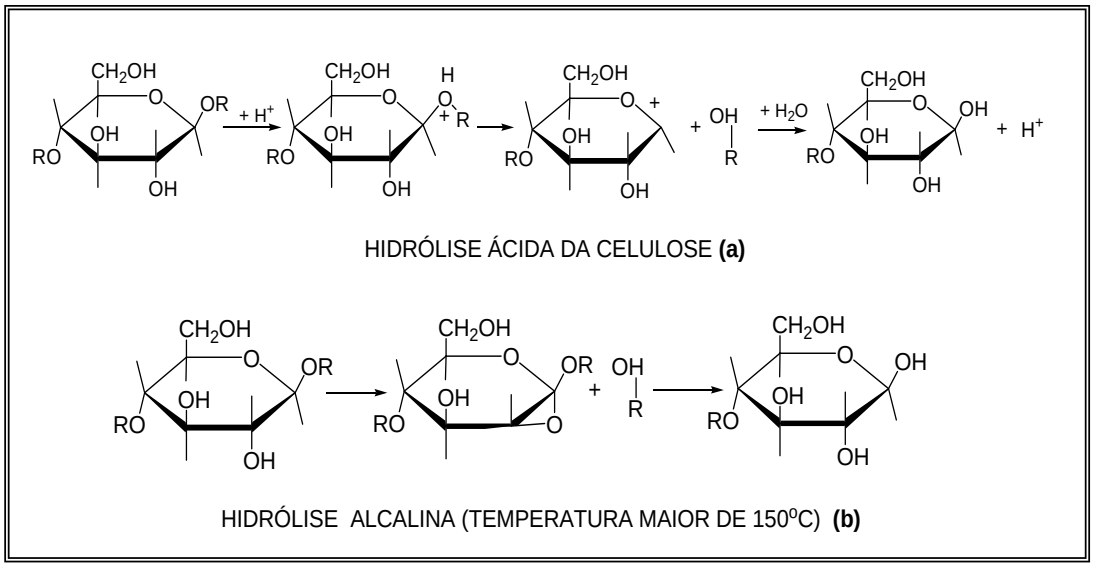


Figura 3.9. Hidrólise química da celulose em meio ácido (a) e em meio alcalino (b) (D´Almeida, 1988)

A hidrólise ácida de celulose em ácido diluído envolve condições de pressão e temperatura elevadas e tempos de exposição baixos, mas só é possível alcançar conversões próximas de 50% de celulose em glicose. Já, altas concentrações de ácido (40-70%) envolvem tempos longos 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 (furfurais), que são inibidores microbiológicos, impossibilitando as etapas de bioconversão e fermentação microbiológicas desejadas em processos posteriores (Badger, 2002).

Degradação Biológica: consiste numa hidrólise enzimática realizada por um conjunto de enzimas denominadas celulases, as quais são produzidas por uma ampla gama de fungos.

As celulases são enzimas que hidrolisam as ligações β(1,4) da celulose e atuam como um sistema multicomponente na sua degradação.

O consórcio enzimático é formado, basicamente, por endoglucanases, exoglucanases e celobiases. As endoglucanases agem diretamente sobre a celulose amorfa produzindo, aleatoriamente, oligômeros de até 6 unidades de glicose. As exoglucanases ou celobioidrolases atuam sobre os extremos da celulose cristalina produzindo, principalmente, celobiose e glicose. Finalmente, a celobiose formada é hidrolisada à glicose pela ação das celobiases ou ß-glucosidases (Lynd *et al.*, 2002).

Outros Tipos de Degradação: os mais importantes são a degradação ocasionada pela luz e a degradação por efeito térmico. No primeiro caso, a degradação ocorre na faixa do ultravioleta (UV) e, no segundo caso, é requerida uma temperatura maior de 140°C. As duas reações são aceleradas, principalmente, na presença de ar, umidade e acidez residual.

A Tabela 3.5 elucida as diferenças básicas entre a celulose e a hemicelulose de forma resumida.

Tabela 3.5. Diferenças entre hemicelulose e celulose (Pereira Jr., 2001)

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 e 14000 unidades de glicose)	Apresenta grau de polimerização baixo (60 e 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

3.1.3. Lignina

A lignina é uma substância química que confere rigidez à parede celular e, nas paredes da madeira, age como um agente permanente de ligação entre as células, gerando uma estrutura resistente ao impacto, compressão e dobra. Tecidos lignificados resistem ao ataque por microrganismos, diminuindo a acessibilidade das enzimas destruidoras da celulose e hemicelulose (D´Almeida, 1988).

A lignina é formada pela polimerização desidrogenativa (iniciada por enzimas) do álcool trans-coniferílico, álcool trans-p-cumarílico e álcool trans-sinapílico (Figura 3.10), os quais produzem uma molécula heterogênea opticamente inativa e com muitas ligações cruzadas. A macromolécula de lignina não pode ser descrita como uma combinação simples de algumas unidades monoméricas ligadas por alguns tipos de ligações, como no caso da celulose e a hemicelulose. Esta dificuldade reside no fato de que a polimerização dos constituintes da lignina apresenta uma alta variedade de ligações (aproximadamente 10 tipos de ligações). A mais importante é β-O-4, que representa 50% das ligações, vista entre as unidades 1-2, 2-4, 4-5, 6-7, 7-8 e 13-14 da molécula (Caramez, 1999; Lemos, 2001).

Esta substância está presente em todas as plantas superiores (madeira e tecidos vasculares), constituindo cerca de 30% de sua composição e conferindo rigidez ao tecido. A maior parte da lignina encontra-se na parede celular, a qual se entrelaça com a hemicelulose (a lignina se liga à xilana através de ligações químicas entre as unidades de fenil propano da lignina e os resíduos de arabinose e ácido glucurônico das xilanas) formando uma matriz que envolve as fibras de celulose (D´Almeida, 1988).

A lignina é encontrada em muitas plantas, porém, sua constituição não é igual em todas elas. Portanto, a lignina não pode ser considerada como uma substância química única. Pode-se classificar a lignina em *ligninas guaiacil* e *ligninas guaiacil-siringil*. A primeira classe inclui as ligninas presentes na maioria das coníferas e a segunda classe, todas as ligninas de angiospermas (arbóreas e herbáceas) incluindo as poáceas. Na *lignina guaiacil* a reação de Mäule é negativa e a oxidação com nitrobenzeno leva a quantidades pequenas de aldeído siríngico, enquanto que na *lignina guaiacil-siringil* a reação de Mäule é positiva produzindo-se quantidades significativas de aldeído siríngico na oxidação com nitrobenzeno (Jung *et al.*, 1999).

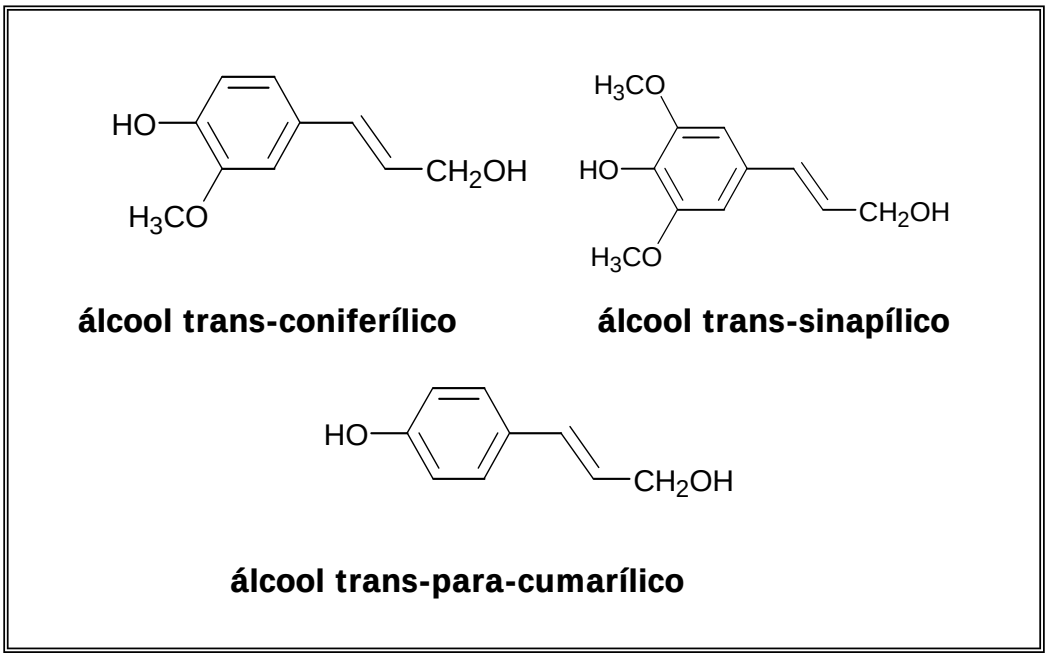


Figura 3.10: Precursores primários da lignina

A presença de lignina nos tecidos vegetais pode ser detectada por meio de uma identificação microscópica ou por via química (D´Almeida, 1988).

Identificação por Microscopia: existem principalmente três reações específicas: *Reação de Cor de Wiesner*, reação específica para lignina proveniente de coníferas; *Reação de Mäule*, positiva para lignina que contém unidades significativas de siringil-propano (*lignina guaiacil-siringil*), lignina de folhosas; e *Safranina*, a qual não é específica porque reage com grupos fenólicos em geral.

Identificação por Via Química:

a. Espectroscopia: 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 *et al.*, 1999).

b. Clássica: os métodos mais clássicos na identificação e quantificação da lignina são: o método *Klason* ou o método *Willstätter*, os quais consistem na hidrólise total dos carboidratos, isolando a lignina como a matéria sólida da solução resultante; o método das cetonas de *Hibbert* que consiste na etanólise das espécies de lignina; o método da oxidação da lignina com nitrobenzeno em meio alcalino, formando a valina siringilaldeído e parahidroxibenzaldeído; o método que utiliza a hidrogenação para obter derivados monoméricos de felnilpropano; e, finalmente, o método que consiste na formação de ácidos tioglicólicos de lignina insolúveis em álcool.

3.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM CELULASES

Existe uma ampla gama de aplicações industriais nas quais são envolvidos processos que empregam celulases. Algumas das tecnologias são processos para a produção de álcool, obtenção de metano por rota biológica, fabricação de doces de frutas, óleos, tecidos a partir de plantas, amido, chá, proteínas, e ainda, no tratamento de efluentes e na sacarificação de biomassas (Godfrey & West, 1996).

Atualmente, a aplicação das enzimas do complexo celulolítico na hidrólise de biomassas lignocelulósicas para a obtenção de licores açucarados tem despertado grande interesse na comunidade científica. As matérias-primas de origem lignocelulósica, discutidas anteriormente, contêm de 20 a 60% de celulose, que pode ser totalmente convertida à glicose, por ação enzimática. Esta molécula se caracteriza por ser um monossacarídeo utilizado pela maioria dos microrganismos, fazendo dele um importante bloco de construção para a obtenção de uma imensa gama de moléculas que abrange desde combustíveis até polímeros (Knauf & Moniruzzaman, 2004).

A hidrólise completa de cada uma das frações lignocelulósicas, sem a produção paralela de substâncias tóxicas aos microrganismos, busca o aproveitamento integral dos resíduos agroindustriais gerados na cadeia produtiva de um produto específico, o que se enquadra no novo conceito de "Biorrefinaria", conferindo valor agregado a estes processos (Thorsell *et al.*, 2004).

A hidrólise enzimática da celulose ocorre sob condições brandas de pressão, temperatura e pH. Sua alta especificidade elimina a chance de ocorrência de furfurais que dificultem os processos subseqüentes. O

consórcio enzimático utilizado na hidrólise da celulose é denominado "enzimas celulásicas", as quais se dividem em três grupos de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico: a) Endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; b) Exoglucanases, que atuam na região externa da celulose; e c) ß-glucosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis a glicose (Lynd *et al.*, 2002; Henrissat, 1991).

a. Endoglucanases (EG)

As endoglucanases (nome sistemático, segundo a IUBMB - *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* - 1,4-ß-D-glucana-4-glucanoidrolases) também podem ser referenciadas na literatura como endo-1,4-ß-D-glucanases, ß-1,4-glucanases, ß-1,4-endoglucana hidrolases, álcali cellulases, celodextrinases e avicelases. Tais enzimas são responsáveis por iniciar a hidrólise, clivam 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 (Lynd *et al.*, 2002). As endoglucanases são as enzimas responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do grau de polimerização), devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (Kleman-Leyer *et al.*, 1996).

b. Exoglucanases (ExG)

O grupo das exoglucanases é constituído pelas celobiohidrolases (CBHs) e pelas glucanohidrolases (GHs). As GHs (nome sistemático 1,4-ß-D-glucana-glucanohidrolases) também podem ser denominadas exo-1,4-ß-glucosidases, exocelulases, exo-ß-1,4-glucosidases, exo-ß-1,4-glucanases, ß-1,4-ß-glucanases e exo-1,4-ß-glucanase. Essas enzimas, embora pouco reportadas, possuem uma característica particular de hidrolisar as fibras celulósicas de elevada importância, liberando glicose diretamente dos terminais do polímero (Lynd *et al.*, 2002).

As CBHs (nome sistemático 1,4-ß-D-glucana-celobiohidrolases) são também conhecidas como exo-celobiohidrolases, ß-1,4-glucana celobiohidrolases, ß-1,4-glucana celobiosilhidrolases, 1,4-ß-glucana celobiosidases, exoglucanases, avicelases, C1 celulases, exo-ß-1,4-glucana celobiohidrolases e celobiosidases. Estas enzimas participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, que é um fenômeno ainda não elucidado completamente. Porém, sabe-se que envolve uma ruptura física do substrato, ocasionando uma desestratificação das fibras pelo aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese 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 ainda podem ser divididas em dois tipos. As enzimas do tipo I (CBHs I) que hidrolisam terminais redutores (R), enquanto as do tipo II (CBHs II) hidrolisam terminais não redutores (NR). Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (Awafo, 1997; Laureano-Perez *et al.*, 2005).

c. ß-glucosidases (BG)

O terceiro e último grupo das enzimas do complexo celulolítico engloba as enzimas ß-glucosidásicas, ou ß-glucosídeo glucohidrolases (nome sistemático). Outras denominações podem ser gentiobiase, celobiase, emulsina, elaterase, aril-ß-glucosidase, ß-D-glucosidase, ß-glicosídeo glucohidrolase, arbutinase, amigdalinase, p-nitrofenil ß-glucosidase, primeverosidase, amigdalase, limarase e salicilinase (Lynd *et al.*, 2005; Laureano-Perez *et al.*, 2005).

As ß-glucosidases têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (GP<7) à glicose. Assim como as celobioidrolases, também são reportadas por sofrerem inibição por seu produto de hidrólise (Awafo, 1997). Porém a inibição pela glicose não se

compara à forte inibição que essas enzimas sofrem quando incubadas na presença de D-δ-gluconolactona, podendo apresentar valores da constante de inibição (KI) na faixa de 5-10 nM (Parry *et al.*, 2001). No entanto, existem exceções. Riou *et al.* (1998) isolaram uma ß-glucosidase de *Aspergillus oryzae* de um extrato bruto, altamente tolerante a potenciais inibidores, que apresentou valores de KI, quando incubada na presença de glicose e de D-δ-gluconolactona, de 1,36 M e 12,5 mM, respectivamente.

As enzimas do complexo celulásico apresentam um efeito sinérgico, ou seja, o rendimento apresentado ao atuar conjuntamente é maior à soma dos rendimentos ao atuar isoladamente. São reportadas três formas de sinergia (Lynd *et al.*, 2005, Lynd *et al.*, 2002; Bhat & Bhat, 1997):

- ✓ **Sinergia EG-ExG:** as endoglucanases atuam nas regiões amorfas da fibra, disponibilizando terminais redutores e não redutores para atuação das CBH I e CBH II, respectivamente.
- ✓ **Sinergia ExG-ExG:** As CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por 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 ß-glucosidases.

Existe ainda um outro tipo de sinergia, não completamente elucidada, que envolve a ação de enzimas não hidrolíticas, nomeadas C1, que se acredita, estão envolvidas na ruptura parcial de ligações hidrogênio intermoleculares e no relaxamento das fibras celulósicas (Bhat & Bhat,

1997). A Figura 3.11 ilustra, de forma geral, a sinergia encontrada entre o complexo celulásico na hidrólise das fibras de celulose.

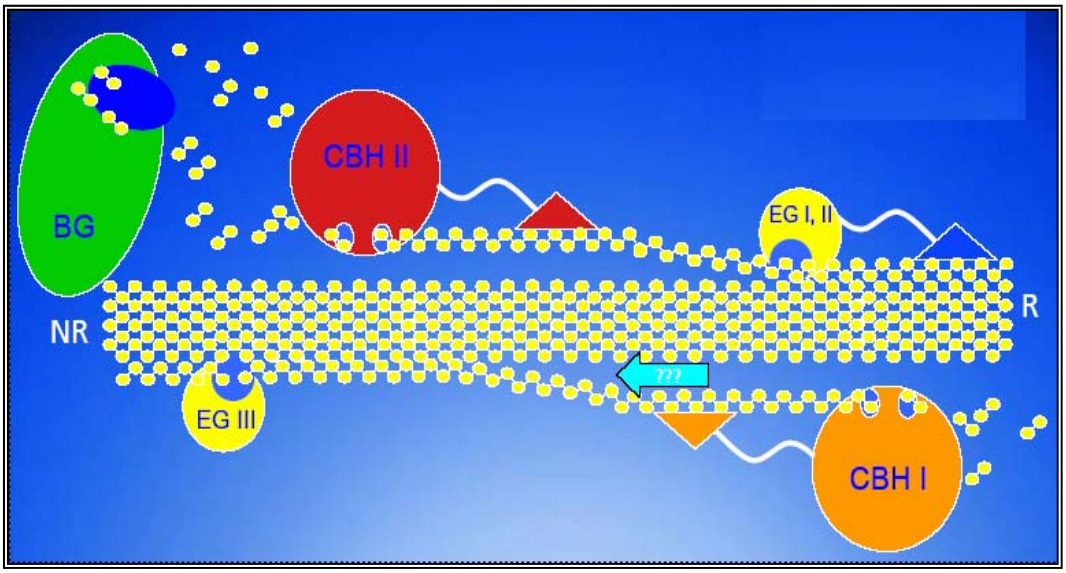


Figura 3.11. Atuação sinérgica das enzimas do complexo celulásico (Rad & Yazdanparast 1998)

Durante a hidrólise de substratos insolúveis, ocorrem basicamente dois fenômenos: a adsorção das celulases na superfície do substrato celulósico e a hidrólise da celulose em açúcares fermentáveis. A seguir, são apresentadas as etapas durante a hidrólise de um substrato celulósico pelas enzimas celulásicas (Awafo, 1997; Rad & Yazdanparast 1998; Klyosov, 1995a; Klyosov, 1995b):

a. difusão do complexo celulásico para a região de localização do substrato celulósico;
b. adsorção do complexo celulásico aos sítios disponíveis no substrato celulósico;
c. formação de um complexo ativo celulases-substrato;
d. hidrólise das ligações glicosídicas do polímero celulósico;

e. difusão dos produtos de hidrólise do sítio ativo celulases-substrato para o meio liquido;
f. dessorção do complexo celulásico do substrato hidrolisado.

Os processos de hidrólise enzimática da celulose e posterior fermentação da glicose liberada vêm sendo estudados sob diferentes estratégias de processamento, *Separate Hydrolysis and Fermentation* (SHF) e *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF), as quais possuem características diferentes quanto ao tipo de processo e ao desempenho das enzimas celulásicas (McMillan, 2004).

3.3. FATORES QUE AFETAM A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Diferentes autores, que têm percebido a importância do processo da hidrólise enzimática da celulose, vêm desenvolvendo diversos trabalhos visando melhorar ou otimizar as condições que afetam o processo (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000b; Adsul et al, 2005). Existem diferentes fatores que podem influenciar o rendimento da hidrólise enzimática, dentre os quais pode-se destacar o pH, temperatura, teor de sólido, relação enzima-substrato, entre outros.

Temperatura e pH: os valores de temperatura e pH relatados na literatura encontram-se, geralmente, dentro dos intervalos no qual o complexo enzimático apresenta o seu maior desempenho. Isto é, temperatura com valores entre 50 e 60°C e pH entre 5 e 6 (Linde *et al.*, 2006; Laureano-Perez *et al.*, 2005; Kurabi *et al.*, 2005; Mais *et al.*, 2002a; Mais *et al.*, 2002b; Menezes e Aguiar, 2002; Ferrer *et al.,* 2002; Vlasenko *et al.*, 1997).

Relação enzima-substrato: a quantidade de enzima utilizada em relação à quantidade de sólido a hidrolisar é um dos fatores mais importantes estudados até agora. Está claro que o aumento na concentração de enzima aumenta a velocidade da hidrólise. Porém, o excesso na concentração de enzima na hidrólise, compromete a viabilidade do processo devido ao alto custo da enzima, o qual implica um incremento no custo do produto. Na literatura existe uma ampla faixa para a relação enzima-substrato que oscila de 5 FPU/g de substrato até 100 FPU/g de substrato (Laureano-Perez *et al.*, 2005; Kurabi *et al.*, 2005; Wingren *et al.*, 2003; Sivers & Zacchi, 1996).

Menezes e Aguiar (2002) concluíram que a relação enzima-substrato é um dos fatores que possui maior influência na hidrólise enzimática da celulose, atingindo o dobro da conversão a glicose quando o nível mais alto de celulases é utilizado (28 EGU/g de bagaço). A adição da β-glucosidase foi igualmente importante para potencializar a hidrólise da celulose.

O rendimento da hidrólise enzimática da celulose aumenta quando se incrementa a carga enzimática. Esta afirmação é valida até que os sítios livres da matriz de celulose se saturam de enzima. Neste ponto, o aumento da concentração enzimática não traz qualquer aporte no aumento do rendimento da hidrólise enzimática (Mais *et al.*, 2002a; Mais *et al.*, 2002b).

O baixo conteúdo de ß-glucosidase nos preparados enzimáticos faz com que, em muitos casos, a adição desta enzima seja necessária para aumentar o rendimento da hidrólise. O objetivo desta adição é promover a redução na inibição das exoglucanases por seus produtos de hidrólise e aumentar a conversão do substrato a glicose (Menezes e Aguiar, 2002; Mais *et al.*, 2002a).

Teor de sólido: baseados na inibição das enzimas celulásicas pela presença de altas concentrações de produto (alguns oligossacarideos e glicose), a relação sólido-líquido torna-se um fator chave para aumentar a conversão da celulose em glicose, atenuando o efeito inibitório dos metabólitos produzidos.

Segundo Mais *et al.* (2002a), para a mesma carga de enzima, 25 FPU/g, quando são empregadas diferentes porcentagens de sólido no meio (5, 7,5 e 10%), percebe-se um aumento na conversão de celulose em glicose, ao diminuir a porcentagem de sólido. Baixas porcentagens de sólido fazem com que os produtos atinjam concentrações baixas no meio, diminuindo a inibição do complexo enzimático. Depois de 12 horas de hidrólise enzimática, a conversão alcançada foi de 100% para um teor de sólido de 5%. Quando o teor de sólido é de 7,5% a hidrólise enzimática demora o dobro do tempo para alcançar uma conversão de 100%. Já para um teor de sólido de 10%, depois de 48 horas de hidrólise enzimática, só foi obtida uma conversão de 88%.

Adicionalmente, Mais *et al.* (2002b) estudaram a interação existente entre a relação enzima-substrato e a concentração de sólido. Uma carga enzimática de 10 FPU/g apresentou uma taxa inicial de hidrólise menor do que quando se utilizou uma carga enzimática de 25 FPU/g. Para porcentagens de sólido de 5% e 7,5%, com uma carga enzimática de 10 FPU/g e 12 horas de hidrólise, mais da metade do substrato foi convertido a glicose (57% e 53 % respectivamente). No período de 48 horas, as cargas enzimáticas de 10 e 25 FPU/g não apresentaram diferenças significativas nas porcentagens de sólido avaliadas (5%, 7,5% e 10%) realizando conversões de até 80%. Quando utilizada uma carga enzimática de 5 FPU/g essa conversão a glicose não superou 60%.

3.4. ETANOL

A maior parte da produção global de biocombustíveis está enfocada no etanol e seus principais produtores são o Brasil e os EUA, que juntos somam 69% da produção mundial. A principal matéria-prima para o etanol no Brasil é a cana-de-açúcar, enquanto que para EUA é o milho. O segundo enfoque está na produção de biodiesel, onde se destaca a Europa como maior produtor, sendo liderada pela Alemanha, França, Itália e Áustria (MAPA, 2005; COM, 2006).

O Brasil é o segundo produtor mundial de etanol, superado pelos Estados Unidos, e seguido pela China, União Européia e Índia (Figura 3.12). No mundo são produzidos anualmente cerca de 13,5 milhões de galoes de álcool etílico, sendo mais da metade deste total destinados ao uso como combustível (Scaramucci & Cunha, 2005; Leal, 2004; MAPA, 2005).

O Brasil é o país mais avançado, do ponto de vista tecnológico, na produção e no uso de etanol como combustível, seguido pelos EUA e, em menor escala, pela Espanha, Suécia, Quênia, Malawi e outros paises. O álcool é utilizado em mistura com gasolina no Brasil, EUA, UE, México, Índia, Argentina, Colômbia e, mais recentemente, Japão. O uso exclusivo do álcool como combustível está concentrado unicamente no Brasil (NAE, 2005).

Em termos gerais o etanol é um líquido incolor e volátil, de odor ardente característico, facilmente inflamável, de chama azulada que não gera fuligem, e muito higroscópico; sua pureza habitualmente é medida por graus Gay-Lussac. No estado desidratado é perfeitamente miscível com substâncias orgânicas ou minerais como ésteres, carburantes e acetonas entre outros. Algumas outras características desta substância

encontram-se sumarizadas na Tabela 3.6 (Somavilla & Gomes Neto, 2005).

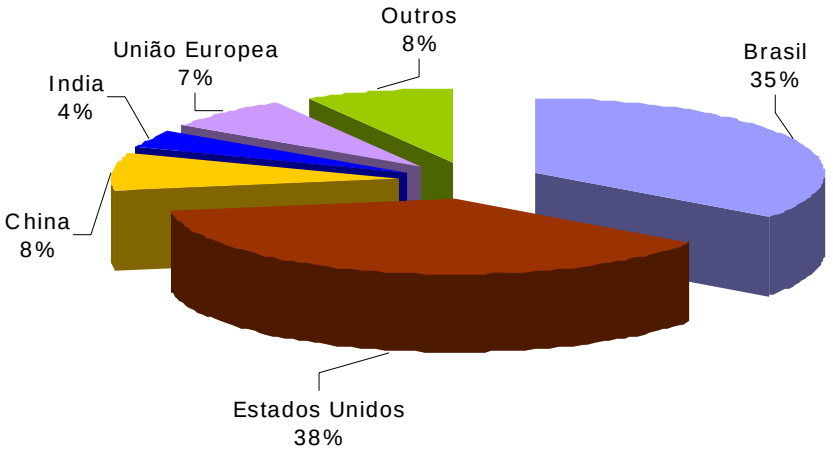


Figura 3.12. Distribuição mundial da produção de etanol
Renewable Fuels Association (2007)

Tabela 3.6. Características físico-químicas do etanol

Formula molecular	CH_3CH_2OH
Peso molecular	46 u.m.a.
Peso específico (20°C)	0,7894 g/mL
Densidade API	47,1
Índice de refração (20°C)	1,3619
Temperatura de ebulição (1 atm)	78,32°C
Temperatura de fusão (1 atm)	-117,22°C
Temperatura de inflamação	12°C
Limite de estabilidade	300°C
Tensão de vapores (0°C)	12,00 mmHg
(20°C)	44,00 mmHg
Calor latente	921096,00 J/kg
Octanagem (ASTM)	99
Índice de Cetano	10
Razão ar:combustível	9,0:1,0

3.4.1. PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL

Desde os tempos antigos, o álcool foi produzido por meio de diversos processos artesanais de fermentação, principalmente, para produção de bebidas de consumo humano. Atualmente, graças ao desenvolvimento da microbiologia industrial, o álcool é produzido em quantidades que permitiram seu uso como combustível e matéria-prima para diversos produtos químicos.

Apesar de serem conhecidos os processos químicos de produção de etanol, o processo de fermentação é ainda o mais utilizado por ser mais econômico. Essa vantagem deve-se, principalmente, ao grande número de matérias-primas naturais baratas (açucaradas e amiláceas, principalmente) que podem ser utilizadas (Schmidell *et al.*, 2001).

Em termos gerais, o processo de bioprodução de etanol pode ser resumido da seguinte forma: a matéria-prima, seja qual for sua origem, é submetida a um pré-tratamento ou uma adequação (física, química ou enzimática) para a liberação dos carboidratos na sua forma monomérica, sendo assim disponibilizados para a realização da fermentação alcoólica, em condições anaeróbias, realizada utilizando leveduras do gênero *Saccharomyces*, sendo a mais comum a da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Contudo, diversas outras leveduras possuem a capacidade de produzir tal composto, como também algumas espécies de bactérias (Leal, 2004; Somavilla & Gomes Neto, 2005).

Para o tipo de processo descrito, toda matéria-prima que contenha glicídios é potencialmente utilizável na produção de etanol sem, no entanto, serem todas economicamente viáveis. Em alguns casos a

matéria-prima utilizada para produção de etanol é responsável, de modo geral, por até 70% do custo global do processo, sendo de primordial importância a busca de matérias-primas de baixo valor e processos que permitam o maior aproveitamento destas fontes (Maiorella *et al.*, 1983; Maistro e Barros, 2002).

Entre as tecnologias maduras, o processo de produção de etanol a partir de caldo de cana (substância sacarínea) predomina no Brasil e é o mais econômico a nível mundial. Neste processo os açúcares estão disponíveis na matéria-prima (cana-de-açúcar) sendo só necessária uma extração mecânica para sua posterior fermentação. No caso de matérias-primas amiláceas, tecnologia predominante nos Estados Unidos, faz-se necessária uma etapa adicional, a hidrólise da molécula de amido, para disponibilizar os carboidratos na sua forma monomérica, sem mencionar a maior dificuldade para a adequação da matéria-prima (grão do milho, geralmente) (Fairbanks, 2003). Cabe destacar que, pelo menos em termos de matéria-prima, o Brasil leva vantagem na produção de etanol. A cana-de-açúcar usada no país tem o menor custo de produção e rende mais litros por hectare: O etanol de cana-de-açúcar tem um custo de produção de US$ 0,22/L e uma produtividade de 6000 litros/hectare, enquanto o álcool produzido de milho apresenta um custo de produção de US$ 0,30/L e uma produtividade de 3100 litros/hectare (Salomão & Poloni, 2007).

A Figura 3.13 esquematiza de uma forma simples a produção de álcool por estas tecnologias maduras e apresenta o que estes dois processos possuem em comum.

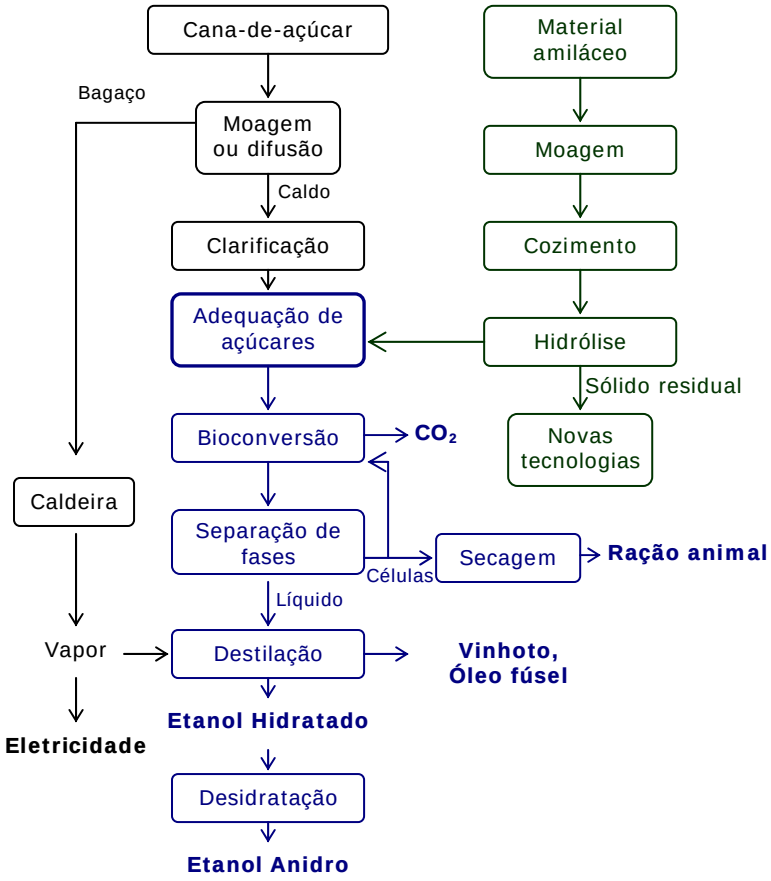


Figura 3.13. Produção tradicional de etanol
Adaptado de Pereira Jr., 1991

As tendências atuais, no entanto, sinalizam como tecnologia emergente a produção de etanol combustível a partir de materiais lignocelulósicos como matéria-prima. Neste caso, o processo apresenta vantagens e desvantagens. As principais vantagens são: o baixo custo da matéria-prima (geralmente resíduo da agroindústria); a disponibilidade do material; a não dependência ao aumento das áreas de cultivo e o alto conteúdo de açúcares na estrutura do material. Como desvantagens encontram-se, principalmente, a necessidade de pré-tratamentos do

material como etapa crucial para a disponibilização dos açúcares, a presença de carboidratos não fermentáveis por *S. cerevisiae,* e, em alguns casos, a necessidade de processos de destoxificação dos meios segundo as condições do pré-tratamento e o microrganismo a ser empregado. Estes processos ao apresentarem uma maior complexidade requerem maiores investimentos, tanto de capital quanto de pesquisa (Philippidis & Hatzis, 1997).

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

Os pré-tratamentos físico-químicos são utilizados para aumentar a suscetibilidade do material lignocelulósico ao ataque enzimático. Caracterizam-se pelo tratamento do material em elevadas pressões e temperaturas, e o posterior resfriamento rápido. Entre os pré-tratamentos deste tipo destacam-se:

- ✓ <u>Explosão a vapor ou auto-hidrólise</u>: Neste processo o material é tratado com vapor de água saturado em alta pressão , seguido de uma despressurização quase instantânea, permitindo a solubilização de alguns monômeros e variados polissacarídeos da fração hemicelulósica, a transformação da lignina e o aumento da susceptibilidade da celulose à posterior hidrólise.

- ✓ Explosão por amônia: Neste caso, o material é impregnado ou embebido numa solução de amônia durante o processo com o intuito de aumentar a taxa de sacarificação da celulose.

- ✓ Explosão por CO_2: Neste caso, o material é impregnado com CO_2 que se transforma no correspondente ácido e incrementa o processo hidrolítico.

No caso dos pré-tratamentos químicos as características de cada processo são variadas. Alguns desses processos são descritos a seguir (Adsul *et al*, 2005):

- ✓ Hidrólise ácida: Neste processo são utilizados ácidos como catalisadores do rompimento entre as frações, e/ou das próprias frações, em condições que variam desde as mais drásticas, com o objetivo de hidrolisar a celulose, até moderadas, para a solubilização seletiva da fração de hemicelulose.

- ✓ Ozonólise: O ozônio é utilizado neste processo para retirar a lignina do material lignocelulósico, deixando-o mais acessível ao ataque enzimático.

- ✓ 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.

- ✓ Deslignificação oxidativa: Neste processo, enzimas peroxidases são utilizadas para biodegradar a lignina em presença de H_2O_2 aumentando a susceptibilidade das fibras a posteriores processos de hidrólises.

- ✓ Processo organosolv: Uma mistura de ácido e solvente orgânico, geralmente etanol, é utilizada neste processo para o rompimento das ligações internas da lignina e da hemicelulose.

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

A transformação dos materiais lignocelulósicos vem sendo estudada sob diferentes estratégias de processamento. Devido à presença de diferentes açúcares, muitas vezes se faz necessário o multiprocessamento, ou seja, o emprego de enzimas simultaneamente à ação de microrganismos. Pode-se ainda utilizar diferentes microrganismos em etapas sucessivas, de maneira a se aproveitar ao máximo a matéria-prima disponível. Neste sentido, 4 estratégias foram concebidas, cada uma com diferente estágio de desenvolvimento.

Hidrólise e Fermentação em Separado (SHF)

É a concepção mais antiga. Neste caso a hidrólise, etapa de pré-tratamento, ocorre num estágio separado da fermentação. Nesta

estratégia, a etapa de hidrólise pode ser realizada química ou enzimaticamente.

Ao ser utilizado um agente químico como catalisador da clivagem da macroestrutura no processo, são formados compostos inibidores de fermentação. Por isso, segundo a severidade da hidrólise, podem ser requeridas etapas de destoxificação posterior, o que não permite fermentação simultânea.

A hidrólise enzimática, geralmente, é conduzida nas condições ótimas de pH e temperatura das celulases. A dificuldade deste processo reside no acúmulo da glicose e polissacarídeos, provenientes da mesma hidrólise, que atuam como inibidores enzimáticos de algumas enzimas envolvidas, decorrendo numa hidrólise incompleta da celulose. Uma vez terminada a hidrólise, o resíduo sólido é separado e o sobrenadante é empregado para fermentação por microrganismos, processo esquematizado nas Figuras 3.14 e 3.15 (Wingren *et al.* 2003; McMillan, 2004).

O primeiro fluxograma mostra um processo em que se utiliza ácido diluído na hidrólise da fração hemicelulósica. Posteriormente, a celulose pode ser hidrolisada enzimaticamente ou pela ação de ácido concentrado. No segundo, a hidrólise é realizada com ácido concentrado, sob elevadas temperaturas, que é capaz de hidrolisar a totalidade da fibra lignocelulósica, porém, o hidrolisado apresenta uma alta carga de inibidores do processo de fermentação.

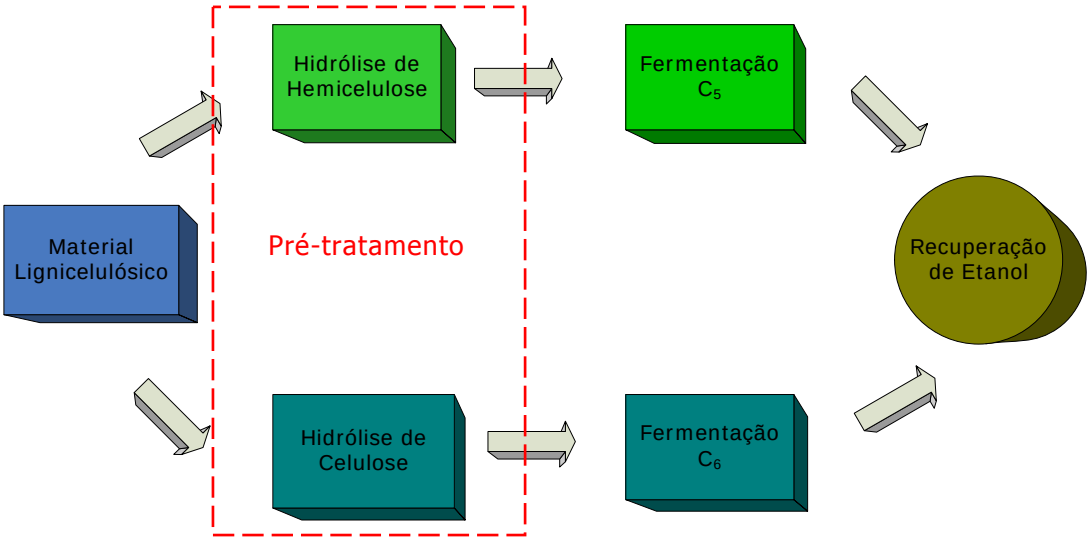


Figura 3.14. Diagrama de blocos do processo SHF-1 (Wingren *et al* 2003)

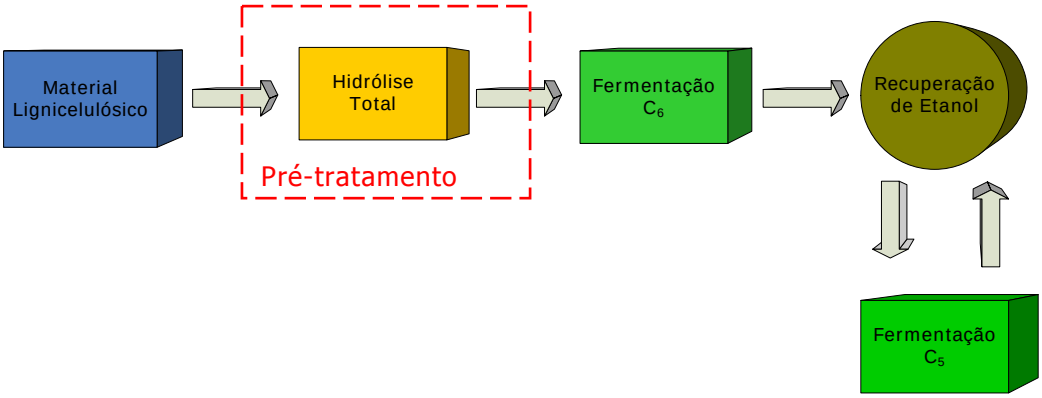


Figura 3.15. Diagrama de blocos do processo SHF-2 (Wingren *et al.* 2003)

Sacarificação e Fermentação Simultâneas (*SSF*)

Neste caso, a sacarificação e fermentação da fração celulósica ocorrem numa única etapa, sendo realizada enzimáticamente a hidrólise da macromolécula, evitando a formação de inibidores, e possibilitando o sinergismo com o microrganismo fermentador. Em etapas separadas são realizadas a clivagem e hidrólise da hemicelulose, assim como a fermentação dos açúcares gerados neste processo. As enzimas empregadas no processo, o complexo celulásico, são também produzidas separadamente.

As enzimas têm como função a hidrólise da celulose até os monômeros de glicose. A glicose produzida inibe as enzimas β-glucosidases que por sua vez interrompem o processo hidrolítico. O microrganismo, ao consumir esta glicose, reativa o processo enzimático e é obtido o produto desejado no processo fermentativo (Wingren *et al.* 2003; Sivers & Zachhi 1996). As Figuras 3.16 e 3.17 apresentam esquematicamente a sinergia existente neste processo entre as enzimas e os microrganismos. As principais características deste processo são:

- ✓ a redução da inibição enzimática pela glicose formada, devido à inexistência do acúmulo desses açúcares no meio;
- ✓ a diminuição da complexidade do processo pela existência de uma única etapa;

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

- ✓ o alcance de maiores índices de conversão a glicose, pois os equilíbrios das reações enzimáticas são deslocados no sentido de formação de mais produto, visto que a glicose é concomitantemente consumida;

- ✓ o desfavorecimento da cinética enzimática pela necessidade de condução do processo em condições compatíveis com as de crescimento da linhagem fermentativa da glicose.

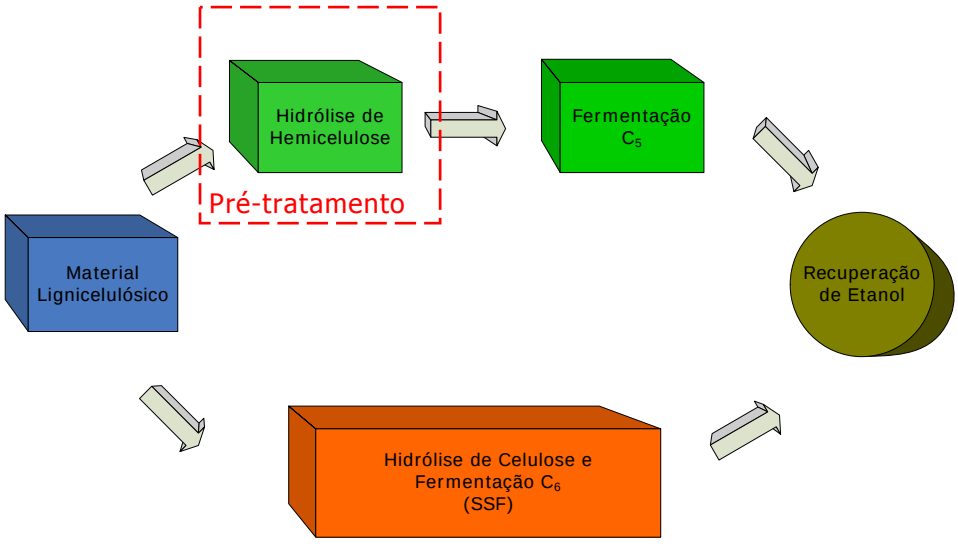


Figura 3.16. Diagrama de blocos do processo SSF

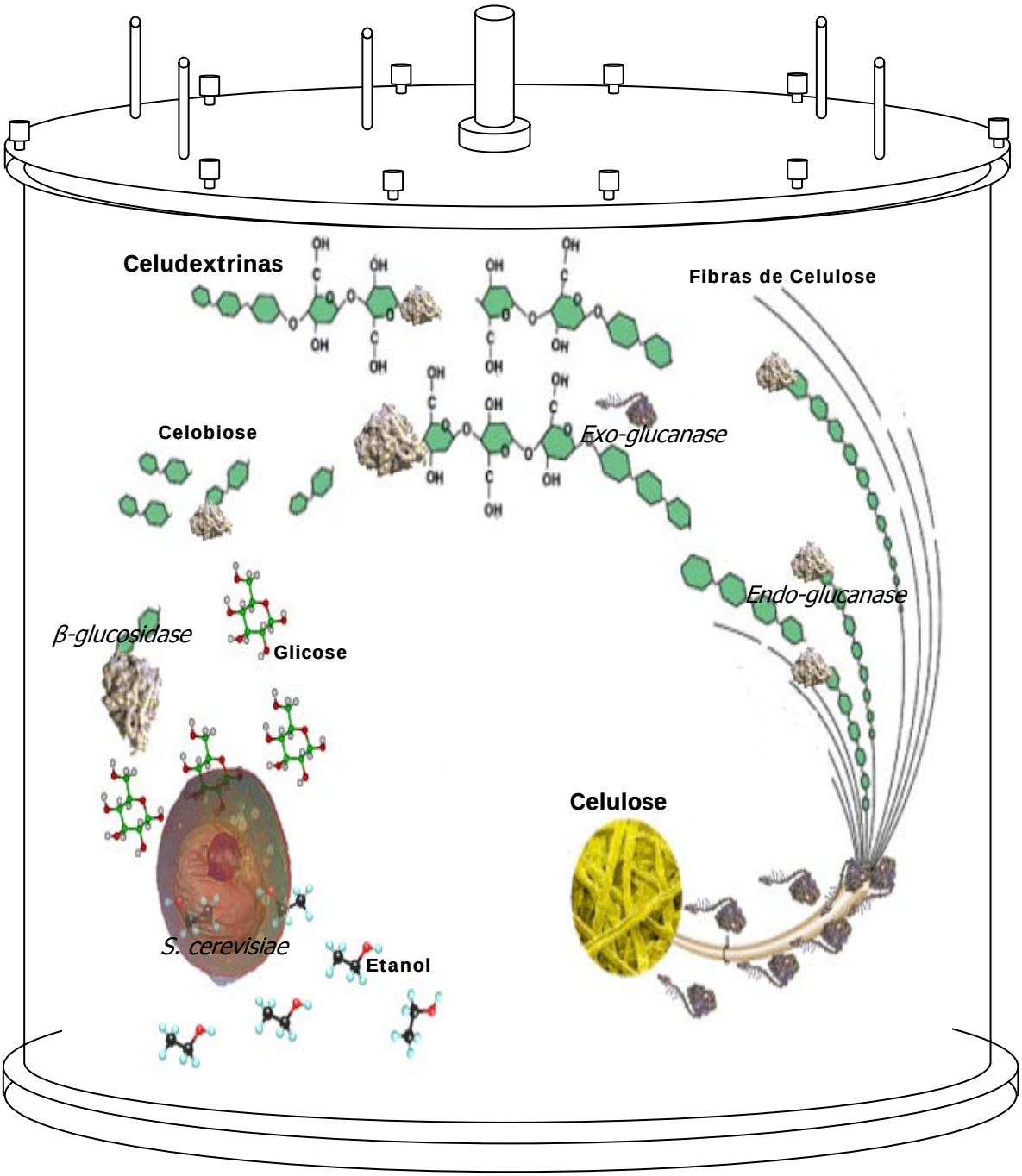


Figura 3.17. Esquema do processo SSF em Biorreator

Sacarificação com Co-fermentação Simultânea (*SSCF*)

Este processo envolve 3 etapas, das quais a hidrólise da fração hemicelulósica e a produção de celulases ocorrem separadamente (Figura 3.18). 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.

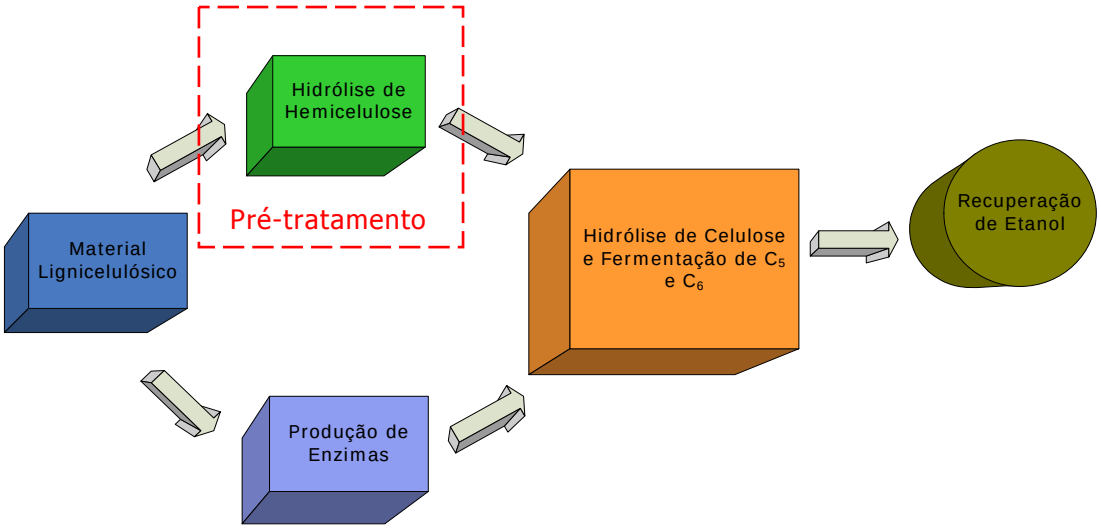


Figura 3.18. Diagrama de blocos do processo SSCF

Bioprocesso Consolidado (*CBP*)

É o processo de concepção mais complexo devido ao envolvimento de, pelo menos, 3 das etapas num único equipamento (Figura 3.19). Para este processo será 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.

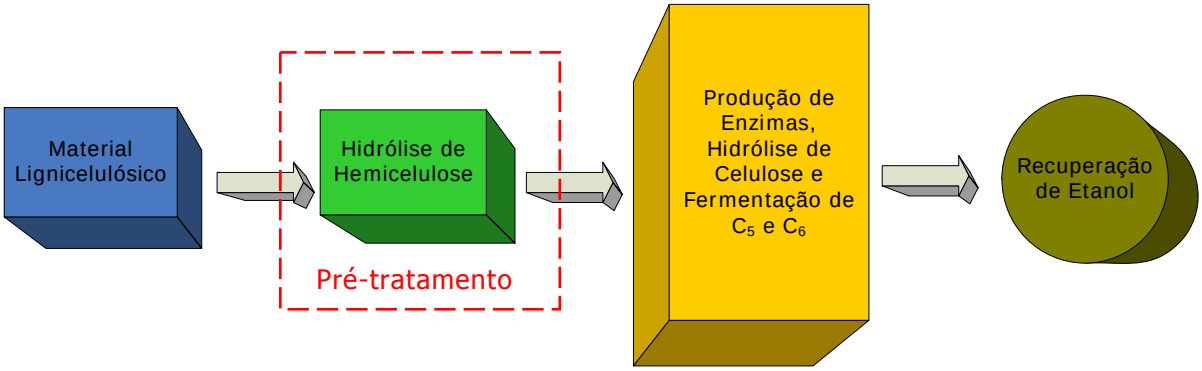


Figura 3.19. Diagrama de blocos do processo CBP-1

O segundo diagrama (Figura 3.20) representa o horizonte tecnológico para a produção de etanol a partir de material lignocelulósico. Um processo no qual todas as etapas críticas para a obtenção de um produto são realizadas em um único equipamento, com um único microrganismo. É uma perspectiva a longo prazo, onde a engenharia genética terá um papel indispensável.

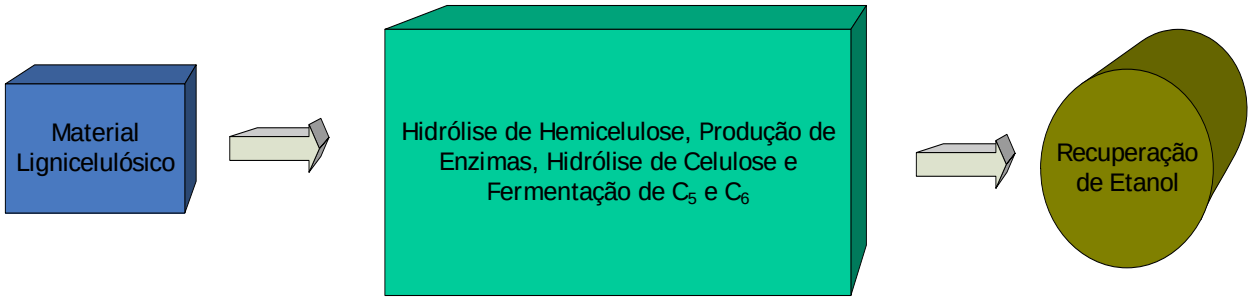


Figura 3.20. Diagrama de blocos do processo CBP-2

3.4.2. APLICAÇÕES DO ETANOL

Desde sempre o etanol foi utilizado, principalmente, na produção de bebidas alcoólicas, vinagres e conservas. Atualmente, o álcool é também utilizado nas indústrias de fármacos, perfumes e cosméticos; na fabricação de corantes e vernizes, materiais explosivos, seda artificial e materiais plásticos além da sua aplicação como matéria-prima de produtos da química fina. O etanol é utilizado também em iluminação e aquecimento; na produção de éter para misturas com carburantes e para fabricação de borracha sintética (Crueger & Crueger, 1993; Kosaric *et al.*, 2001).

No entanto, sendo o etanol uma fonte líquida de energia facilmente estocável, com alto conteúdo de oxigênio (35%) e combustão limpa, tem seu maior potencial de aplicação na área dos combustíveis, sendo utilizado como alternativa à gasolina, como aditivo da mesma e/ou como insumo na produção de biodiesel (Crueger & Crueger, 1993; Somavilla & Gomes Neto, 2005).

Na atualidade, pesquisas estão sendo desenvolvidas visando à utilização do etanol como fonte de hidrogênio para sua aplicação nas denominadas células de combustível, aproveitando sua relação carbono/hidrogênio, com alto teor de hidrogênio (C_2H_6, ou seja 1:3) e vantagens quanto a questões ambientais e de saúde ocupacional que o etanol apresenta sobre o metanol, a substância com a melhor relação carbono/hidrogênio (1:4) (Somavilla & Gomes Neto, 2005).

Cabe destacar que a utilização de etanol apresenta as seguintes vantagens:

- ✓ É um *commodity* de alta pureza;
- ✓ Fácil transporte e estocagem;
- ✓ Facilmente miscível com água;
- ✓ Baixo perigo de explosão;
- ✓ Esterilizável;
- ✓ Facilmente oxidável;
- ✓ Pode ser utilizado como substrato em processos biotecnológicos.

Na Figura 3.21 são apresentadas as aplicações mais comuns para o etanol e alguns dos produtos derivados deste álcool, assim como algumas das substâncias obtidas por meio de biotransformação microbiana (Kosaric *et al.*, 2001).

Mundialmente, 13% do etanol produzido é utilizado na fabricação de bebidas, 21% para o setor industrial e o 65% restante é aproveitado no setor de combustíveis (ANP, 2005).

A utilização do etanol como combustível de veículos leves, ou como aditivo na gasolina, decorre da necessidade estratégica de reduzir a

dependência do setor de transporte aos combustíveis derivados do petróleo (Santos, 2002). Esta necessidade torna-se maior nos períodos de aumentos excessivos no preço do petróleo, gerados por causas tão diversas como as crises no oriente médio (1979) ou o forte inverno de 1999. Nos últimos anos, impulsionado pela problemática do Iraque, entre outras razões, o preço do petróleo vem aumentando gradativamente, superando o valor dos U$ 69,87 por barril (EIA, 2007).

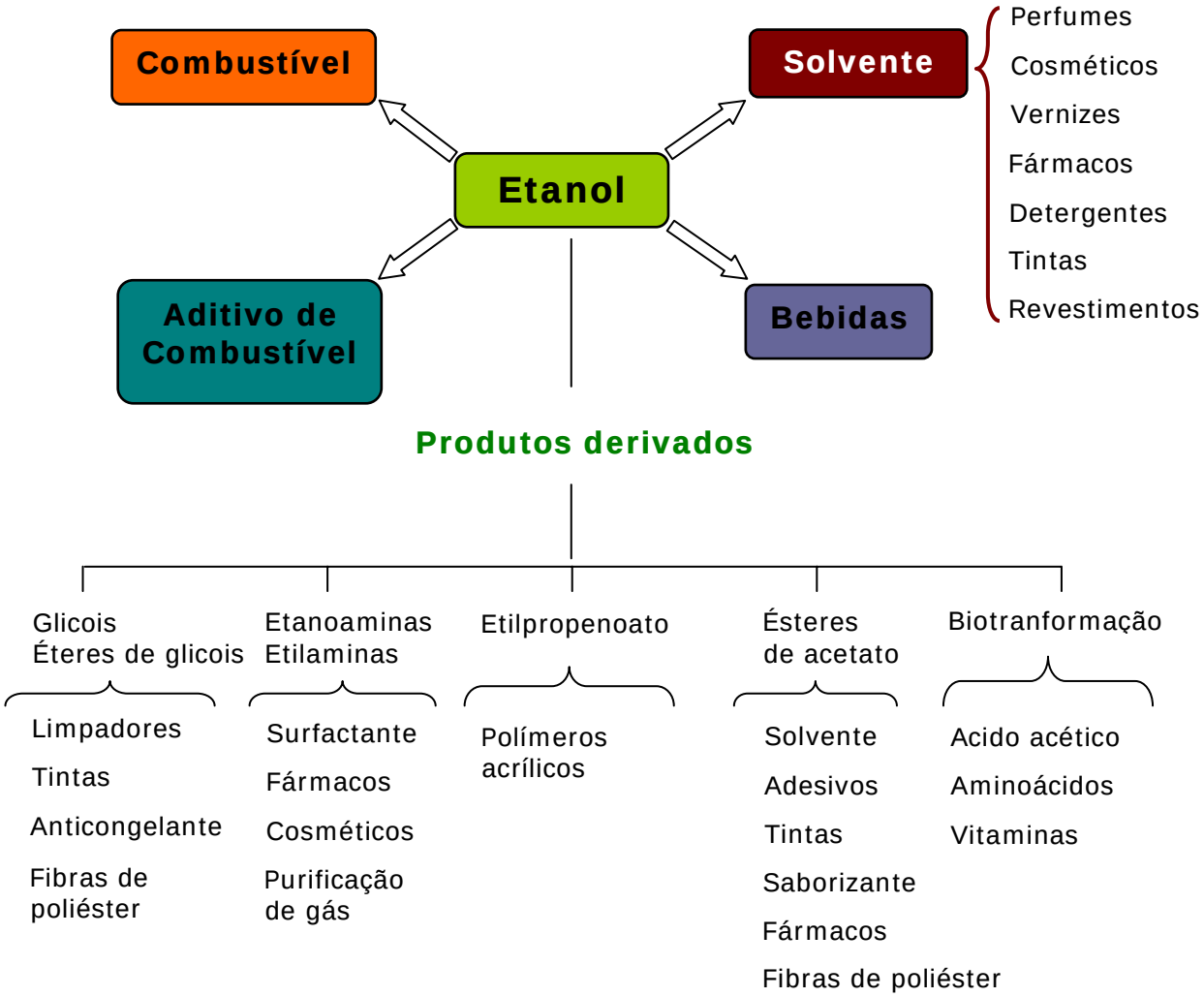


Figura 3.21. Aplicações do Etanol

Além de ser uma alternativa à problemática econômica do mercado do petróleo, o álcool hidratado e a mistura etanol-gasolina apresentam diversas vantagens ambientais. Por exemplo, quando utilizados como combustíveis, comparados à gasolina, apresenta-se uma redução nas emissões de enxofre, CO_2, particulados e outras substâncias poluentes, como tem sido demonstrado em testes das concessionárias Volkswagen e Ford. No caso da utilização de etanol anidro, as reduções nas emissões de CO, hidrocarbonetos e NO_X atingem 57%, 64% e 13%, respectivamente (Somavilla & Gomes Neto, 2005; Pereira Jr., 1991; Ometto *et al.*, 1985; Santos, 2000a). Cabe destacar que, no caso de combustão incompleta, o acetaldeído gerado pelo uso do etanol é menos agressivo para a saúde humana do que o formaldeído gerado com a utilização da gasolina.

Associada à diminuição de poluentes, a utilização do etanol, como combustível, leva à redução do desbalanceamento global no ciclo do carbono gerado pelo uso dos combustíveis fósseis, de caráter não renovável, o que tem aumentado gradativamente a quantidade de CO_2 atmosférico, um dos gases causadores do "efeito estufa". Este fenômeno de aquecimento da terra é provocado pelo acúmulo, na atmosfera, de gases que são transparentes à luz solar e refratários ao calor, permitindo assim que a luz solar atravesse a atmosfera sem que o calor gerado seja dissipado (Lee, 1996; Knauf & Moniruzzaman, 2004)

Essa redução do desbalanceamento no ciclo do carbono, explica-se pela absorção de CO_2 atmosférico realizado pelas plantas, fonte de açúcares fermentáveis, durante o processo de fotossíntese. Essa absorção de carbono, embora temporária, gera os chamados créditos do carbono previstos no protocolo de Kyoto, negociáveis com países poluidores (Fairbanks, 2003; Knauf & Moniruzzaman, 2004). Algumas estimativas indicam que a indústria canavieira brasileira é responsável

por uma redução de 9,5 milhões de toneladas de CO_2 atmosférico, correspondentes a 18% das emissões geradas pela utilização dos combustíveis fósseis. Adicionalmente, no caso de derramamentos ou vazamentos, o etanol não apresenta os prejuízos ambientais de outros combustíveis oxigenados (Lee, 1996).

A crescente demanda de etanol, aliada ao rápido crescimento populacional, aos progressos tecnológicos referentes à produção, uso e abastecimento, e as vantagens ambientais numeradas com sua utilização, fazem do etanol um combustível alternativo com um futuro promissor (Somavilla & Gomes Neto, 2005).

3.4.3. ETANOL NO CONTEXTO DA BIORREFINARIA

A importância do setor agroindustrial e florestal junto à instabilidade dos preços do petróleo fazem que a biomassa se projete como um recurso produtivo. Neste sentido as biorrefinarias constituem uma nova oportunidade para o setor das biomassas e poderiam fomentar novas fontes de negócios e produtos (Pereira Jr., 2006).

Especialistas acreditam que as biorrefinarias possam vir a se constituir em uma indústria-chave do século XXI, responsável até mesmo por uma nova revolução industrial, em virtude da importância das tecnologias que empregam e dos efeitos sobre o paradigma industrial (Copyright POWER, 2007).

Uma biorrefinaria é um complexo industrial, no qual se integram processos de conversão de resíduos florestais ou agrícolas, para a produção de combustíveis, energia, produtos químicos e materiais de

interesse no mercado industrial. O conceito é análogo ao das atuais refinarias de petróleo, as quais a partir do petróleo cru conseguem elaborar uma variedade de produtos químicos. Berg (2006) afirma que no futuro vão-se estabelecer novos empregos para a biomassa agroindustrial, tal como combustíveis padronizados, sejam estes sólidos, líquidos ou gasosos; e serão produzidos novos materiais, com novas propriedades e uma excelente competitividade no mercado. Esta é a razão pela qual se acredita firmemente no potencial da biomassa como matéria-prima cada vez mais importante.

A rota das biorrefinarias está associada ao desenvolvimento da tecnologia de lignocelulose, uma técnica em desenvolvimento no mundo, especialmente nos países mais desenvolvidos, com o objetivo de produzir etanol de resíduos e produtos agroindustriais, como o bagaço e a palha de cana, o sabugo de milho, alguns tipos de capim e outras matérias-primas vegetais. Segundo o trabalho do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), esses compostos orgânicos, hoje praticamente sem valor comercial, correspondem a cerca de 50% da biomassa terrestre.

Os esforços para aumentar a competitividade dos combustíveis de base biológica estão fazendo surgir nos EUA um novo modelo de planta de refino, as biorrefinarias. Com operação semelhante à das refinarias tradicionais de petróleo, com a diferença que sua matriz energética é a biomassa e não o petróleo, as biorrefinarias processam diferentes tipos de biomassa e geram uma ampla gama de combustíveis de base biológica (Pereira Jr., 2006; Tidei, 2002).

Relatório recentemente elaborado pelo Conselho Nacional de Pesquisa do governo norte-americano considera as biorrefinarias fundamentais para tornar os combustíveis e demais produtos de base biológica mais

competitivos em relação a seus equivalentes de base fóssil. Tanto que esses empreendimentos deverão receber subvenção governamental da ordem de US$ 15 milhões por ano, durante cinco anos, para a comercialização de tecnologias de biorrefino (Pereira Jr., 2006, Tidei, 2002).

Enquanto que as refinarias de petróleo são substituídas, a sociedade e o ambiente irão se beneficiando pelo cambio de matéria-prima proveniente de hidrocarbonetos a carboidratos renováveis como fonte de energia, novos materiais e produção de químicos. As tecnologias de etanol baseadas em biomassa estão desenvolvendo-se rapidamente, embora alguns obstáculos tenham sido identificados e necessitem ser superados para conseguir uma comercialização ampla e generalizada. As pesquisas atuais estão sendo incentivadas pela necessidade de reduzir o custo do etanol a partir de biomassa. O método mais empregado é o pré-tratamento termoquímico do material lignocelulósico, seguido pela hidrólise enzimática do material a açúcares fermentáveis, que logo podem ser convertidos em etanol. As pesquisas sobre pré-tratamentos se concentram na elaboração de processos que possam ajudar na redução do tempo de bioconversão, na diminuição do emprego de carga enzimática e no aumento dos rendimentos de etanol (Knauf & Moniruzzaman, 2004).

Os esforços das pesquisas em preparados enzimáticos estão concentrados no desenvolvimento de uma mescla sinérgica de enzimas que seja economicamente viável e altamente termoestáveis, que satisfarão as necessidades dos usuários finais. Estão sendo estudados, fortemente, os microrganismos que conseguem converter os açúcares provenientes das frações polissacáridicas (glicose, xilose, manose, galactose) dos resíduos lignocelulósicos, devido ao conteúdo de algumas toxinas provenientes dos pré-tratamentos realizados para facilitar a

disposição das frações hemicelulósica e celulósica, deste material, a etanol e produtos de alto valor agregado (Knauf & Moniruzzaman, 2004).

As pesquisas integradas e o enfoque sobre o desenvolvimento de tecnologias para a produção de etanol dentro do conceito de biorrefinaria têm dado resultado, e as plantas comerciais para a produção de etanol a partir de biomassas estão por se converter em realidade (Knauf & Moniruzzaman, 2004). O Brasil, com uma trajetória de trinta anos na produção de etanol como combustível, possui iniciativas nacionais que contemplam o desenvolvimento de novas tecnologias de produção de etanol com base em biomassa; estes resíduos lignocelulósicos provirem da produção do etanol o da produção de açúcar de cana-de-açúcar. A instalação de biorrefinarias, dentro de um enfoque e de uma estratégia própria, decorrente da especificidade do bagaço de cana-de-açúcar em termos de custo e balanço energético positivo, é outra das iniciativas nacionais para o desenvolvimento de tecnologias para a produção de etanol a partir de biomassas.

O conceito de biorrefinaria ainda é muito pouco difundido no Brasil, mas é extremamente promissor, em longo prazo. A realidade nacional se encaixa perfeitamente neste contexto, graças à diversidade de recursos naturais aqui existentes. A grande dificuldade em se desenvolver este conceito é o enorme aporte de capital que este exige, dificultando a implementação na condição de biorrefinaria associada. Porém o potencial dos resíduos e subprodutos do bagaço é tão grande, que neste caso o etanol pode vir a deixar de ser o produto principal, frente ao alto valor agregado que possuem os subprodutos que podem ser gerados (Pereira Jr., 2006).

Apenas um terço da biomassa contida na planta da cana-de-açúcar é, atualmente, aproveitada para a produção de açúcar e, eventualmente,

etanol. O primeiro grande desafio a ser enfrentado nesse assunto é como aproveitar os dois terços restantes da planta. A tentação é óbvia: trata-se de transformar em açúcar, ou em álcool, a celulose e a hemicelulose contidas no bagaço da cana e, também, nas pontas e na palha que, hoje, são queimadas ou deixadas no campo (UNICAMP, 2006).

A biorrefinaria da Oxiteno já tem um projeto conceitual, elaborado por uma empresa sueca, a unidade deverá produzir açúcares e álcool a partir de insumos hoje rejeitados, como bagaço, palha e pontas da cana-de-açúcar por meio de uma tecnologia chamada hidrólise ácida. A futura unidade vai também produzir etilenoglicol e propilenoglicol, produtos hoje fabricados pela empresa, com uma tecnologia que utiliza o hidrogênio para transformar açúcares (hidrogenólise); e a sua vez produzira outros produtos alcoolquímicos a partir de tecnologias não-convencionais. Esta biorrefinaria da Oxiteno tem previsão para entrar em operação em cinco anos, e deverá ser financiada pelo BNDES com recursos da linha de crédito para inovação (Copyright POWER, 2007).

3.4.4. PRODUÇÃO DE ETANOL POR SSF NA LITERATURA

As seguintes tabelas apresentam um resumo das condições empregadas, tanto na hidrólise enzimática (Tabela 3.7) como no processo SSF (Tabela 3.8), nos reportes mais representativos sobre este tema na literatura.

Tabela 3.7. Resumo de condições empregadas para a hidrólise enzimática na literatura

Tabela 3.8. Resumo de condições empregadas para o processo SSF para produção de etanol na literatura (HE: Hidrólise Enzimática, MO: Microrganismo).

Material	Pré-trat.	Carga Enzimática		Teor de Sólido (%)	Conversão (%)	Tempo (h)	Referência
		Celulases (FPU/g)	B-glucosidase (UI/g)				
Softwood	Explosão com vapor (SO_2) e peróxido alcalino quente	20	35	2	98	72	Lu *et al.*, 2002
Softwood	Explosão com vapor e peróxido alcalino quente	20	35	5	90	72	Lu *et al.*, 2002
Softwood	Explosão com vapor (SO_2) e peróxido alcalino quente	20	35	10	85	72	Lu *et al.*, 2002
Bagasse	Pré-Tratamento Alcalino	28	42	5	59	72	Menezes & Aguiar, 2002
Bagasse	Pré-Tratamento Alcalino	28	42	5	46,41	72	Menezes & Aguiar, 2002
Bagasse	Pré-Tratamento Alcalino	7	14	5	9,5	72	Menezes & Aguiar, 2002
Rice Straw	AFEX	6,7	6,7	10	32	72	Vlasenko *et al.*, 1997

Material	Pré-trat.	Carga Enzimática		Teor de Sólido (%)	Conversão (%)	Tempo (h)	Referência
		Celulases (FPU/g)	B-glucosidase (UI/g)				
Douglas-fir	Explosão com vapor (SO_2)	10	-	5	30	72	Kurabi *et al.*, 2005
Rice Straw	Swan	100	-	15	100	72	Vlasenko *et al.*, 1997
Rice Straw	Ácido	100	-	15	100	72	Vlasenko *et al.*, 1997
Corn Stover	10% NaOH	25	-	5	60	72	Varga *et al*, 2002
Corn Stover	5% NaOH	25	-	5	73	72	Varga *et al*, 2002
Corn Stover	1% NaOH	25	-	5	78	72	Varga *et al*, 2002
Douglas-fir	Organosolv	10	-	5	50	72	Kurabi *et al.*, 2005
Douglas-fir	Extração alcalina	40	80	2	85	72	Pan *et al.*, 2005
Hardwood	Organosolv	10	20	5	(17g/L)	12	Berlin *et al.*, 2006
Hardwood	Organosolv	10	SIM	5	(11g/L)	12	Berlin *et al.*, 2006

Material	Pré-trat.	Carga Enzimática		Teor de Sólido (%)	Conversão (%)	Tempo (h)	Referência
		Celulases (FPU/g)	B-glucosidase (UI/g)				
Alfalfa	Explosão com vapor (Amonia)	5	28,3		88	72	Ferrer *et al.*, 2002
Bagasse	Explosão com vapor (H_2SO_4)	0,414	0,4	5	80		Martin *et al.*, 2002
Bagasse	Explosão com vapor (SO_2)	0,414	0,4	5	81		Martin *et al.*, 2002
Alfalfa	NaOH-Etanol	45	36	5	56	24	Sewalt *et al.*, 1997

Material	Pré-trat.	MO	Inóculo (g/L)	Carga Enzimática		Teor de Sólido (%)	Pré-HE	Conc. de etanol (g/L)	Tempo SSF (h)	Q (g/L.h)	Referência
				Celulases (FPU/g)	B-glucosidase (UI/g)						
Salix (HW)	Explosão com Vapor(SO_2)	Lev.	3,0	15	-	9	Não	27.5	72	0,38	Sassner *et al*, 2006
Corn Stover	Explosão com Vapor(SO_2)	Lev.	1,8	15	-	10.6	Não	31	72	0,43	Sassner *et al*, 2006
Spruce (SW)	Explosão com Vapor(SO_2)	Lev.	2,5	15	-	10	Não	38.7	72	0,54	Sassner *et al*, 2006
Barley Straw	Explosão com Vapor (H_2SO_4)	Lev.	5,0	20	25	5	Não	16	120	0,13	Linde *et al*, 2006
Barley Straw	Explosão com Vapor (H_2SO_4)	Lev.	5,0	20	25	7.7	Não	25	150	0,17	Linde *et al*, 2006
Barley Straw	Explosão com Vapor (H_2SO_4)	Lev.	5,0	20	25	10	Não	25	120	0,21	Linde *et al*, 2006
Piecea abies spruce	Explosão com Vapor (SO_2)	Lev. de Panif.	5,0	15	23	5	Alim. por 16h 50g glicose	26	71	0,37	Wingren *et al*, 2005
Piecea abies spruce	Explosão com Vapor (SO_2)	Lev. de Panif.	5,0	7.5	23	5	Alim. por 16h 50g Glicose	24	71	0,34	Wingren *et al*, 2005

Material	Pré-trat.	MO	Inóculo (g/L)	Carga Enzimática		Teor de Sólido (%)	Pré-HE	Conc. de etanol (g/L)	Tempo SSF (h)	Q (g/L.h)	Referência
				Celulases (FPU/g)	B-glucosidase (UI/g)						
Piecea abies spruce	Explosão com Vapor (SO_2)	Lev. de Panif.	-	32	28	2	Não	7	96	0,07	Stenberg *et al*, 1999
Piecea abies spruce	Explosão com Vapor (SO_2)	Lev. de Panif.	-	32	28	5	Não	19	96	0,20	Stenberg *et al*, 1999
Piecea abies spruce	Explosão com Vapor (SO_2)	Lev. de Panif.	-	32	28	7,5	Não	25	96	0,26	Stenberg *et al*, 1999
Höör (SW)	Explosão com Vapor (SO_2)	*S. cerevisiae*	0,5	32	28	5	Não	19	72	0,26	Alkasrawi *et al.*, 2002
Wheat straw	Explosão com Vapor (H_2SO_4)	*K. marxianus*	0,2	15	12,6	10	Não	0,6	72	0,01	Ballesteros *et al.*, 2006
Olive Wood	Explosão com Vapor (SO_2) e Deslignif. com Peróxido alcalino	*S. cerevisiae*	-	15	12,6	10	Não	29,4	72	0,409	Ruiz *et al*, 2006
Caule de girassol	Explosão com Vapor (SO_2) e Deslignific. com Peróxido alcalino	*S. cerevisiae*	-	15	12,6	10	Não	20,9	72	0,291	Ruiz *et al*, 2006

Material	Pré-trat.	MO	Inóculo (g/L)	Carga Enzimática		Teor de Sólido (%)	Pré-HE	Conc. de etanol (g/L)	Tempo SSF (h)	Q (g/L.h)	Referência
				Celulases (FPU/g)	B-glucosidase (UI/g)						
Corn Stover	Explosão com Vapor (SO_2)	Lev. de Panif.	1,0	10	16,7	10	16h	26,7	96	0,278	Öhgren *et al.*, 2007
Corn Stover	Explosão com Vapor (SO_2)	TMB3400 (MG)		15	25	Alim.	Não	36,8	72	0,511	Öhgren *et al.*, 2006
Salix (HW)	Explosão com Vapor (SO_2)	*S. cerevisiae*	3,3	15	23	9	2h	32	78	0,410	Sassner *et al.*, 2006a
Salix (HW)	Explosão com Vapor (SO_2)	*S. cerevisiae*	3,1	15	25	11	2h	34	120	0,283	Sassner *et al.*, 2006a
Bagasse	Explosão com vapor (H_2SO_4)	TMB3001 (MG)	0,2	8,3	7,8	5	Não	12	48	0,250	Martin *et al.* 2002
Bagasse	Explosão com vapor (SO_2)	TMB3001 (MG)	0,2	8,3	7,8	5	Não	12	48	0,250	Martin *et al.* 2002

CAPÍTULO 4

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. A levedura foi isolada no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.2. MEIO DE MANUTENÇÃO. A composição do meio que foi utilizado para a manutenção de *Saccharomyces cerevisiae* está apresentada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Composição do meio de manutenção

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	20,0
Peptona	5,0
Extrato de Levedura	3,0
Agar-Agar	30,0

O pH do meio foi ajustado em 5,0 adicionando-se HCl 2M e/ou NaOH 2,5M.

Após 72 horas de incubação a uma temperatura de 30°C, as placas de Petri foram conservadas a 4°C por um período de 2 a 3 meses.

4.3. MEIO DE PRÉ-INÓCULO E INÓCULO. A composição do meio que foi utilizado na preparação do inóculo está indicada na Tabela 4.2. (Danesi, 2006 e Sreekumar, 1999).

Tabela 4.2. Composição do meio de inóculo

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	20,0
Fosfato de Potássio	1,10
Uréia	1,25
Extrato de levedura	1,50
Solução de sais minerais e ácido cítrico	40 mL/L

O pH foi ajustado a 5 com HCl 2M e/ou NaOH 2M. Para evitar reações de escurecimento (Reação de Maillard e caramelização), a solução de glicose foi esterilizada separadamente a 0,5 atm por 20 min, de modo que esta representasse 50% do volume total e a solução dos demais nutrientes, os 50% restantes.

A composição da solução de sais minerais e ácido cítrico que foi utilizada neste trabalho é apresentada na Tabela 4.3 (Du Preez *et. al*, 1985):

Tabela 4.3. Composição da solução de sais e ácido cítrico

Componente	Concentração (g/L)
$MgSO_4.7H_2O$	12,5
$CaCl_2.2H_2O$	1,25
$FeSO_4.7H_2O$	0,90
$MnSO_4$	0,19
$CuSO_4.5H_2O$	0,025
$ZnSO_4.7H_2O$	0,30
$CoCl_2.6H_2O$	0,025
$NaMoO_4.2H_2O$	0,035
H_3BO_3	0,050
KI	0,009
$Al_2(SO_4)_3$	0,0125
Ácido Cítrico	12,5

O pré-inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de volume de meio de cultura (devidamente esterilizado), contendo de 3 a 5 colônias da levedura, mantidas em agitador rotatório a 200 rpm, a uma temperatura de 30°C pelo período de 24 horas.

No inóculo foram utilizados frascos cônicos. O volume de trabalho foi igual a 40% do volume total do frasco (erlenmeyer de 500 mL). O volume do pré-inóculo adicionado foi equivalente a 10% do volume de

meio nos frascos (20 mL). Os meios inoculados foram incubados a 30°C por 36 horas, uma agitação de 200 rpm, como especificado por Danesi *et al*. (2006). Após a etapa de propagação, procedeu-se à quantificação das células e posterior cálculo do volume a ser centrifugado (7000 rpm por 10 min) para obter a quantidade de células requeridas para alcançar a concentração desejada para o início da fermentação.

4.4. MATÉRIA-PRIMA. O bagaço de cana-de-açúcar, *Saccharum spp*, 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.

4.5. PROCESSOS DE DESLIGNIFICAÇÃO. Em geral, a maioria dos métodos de deslignificação reportados na literatura propõem tratamentos alcalinos, acompanhados ou não, de um tratamento térmico (Papatheofanus *et al*., 1995; Menezes e Aguiar, 2002; Eriksson *et al*., 2002; Sewalt *et al*., 1997). Os pré-tratamentos de deslignificação avaliados neste trabalho estão especificados na Tabela 4.4.

As hidrólises enzimáticas foram realizadas com 3 diferentes consórcios enzimáticos comerciais, Spezyme®CP e GC220 (*Genercor International*), e Celluclast 1.5L FG (*Novozymes*). As quantidades liberadas de glicose e celobiose, no processo de hidrólise enzimática,

foram os parâmetros de comparação para avaliar tanto os pré-tratamentos como os diferentes preparados enzimáticos.

Tabela 4.4. Processos de deslignificação aplicados sobre a *celulignina*

CODIGO	PRÉ-TRATAMENTO
A	NaOH 0,5M - relação S:L 1:20 - 20 min – T. ambiente
B	NaOH 0,1M - relação S:L 1:20 - 20 min – T. ambiente
C	H_2O destilada - relação S:L 1:4 - 20 min – T. ambiente
D	H_2O destilada - relação S:L 1:4 - 121°C por 40 min
E1	NaOH 0,1M - relação S:L 1:20 - 70°C por 20 min
E2	NaOH 0,5M - relação S:L 1:20 - 70°C por 20 min
F	Solução de Etanol 87% e H_2SO_4 2M - relação S:L 1:20 - refluxo 81±2°C por 90 min. (Papatheofanus *et al.*, 1995)
G	NaOH 4% - relação S:L 1:20 - 121°C por 30 min (Menezes e Aguiar, 2002)
H	NaOH 1M - relação S:L 1:20 - 20 min – T. ambiente
I	Etapas seqüenciais de 10 lavagens com NaOH 0,5M - 10 min – T.ambiente
K	Solução de Etanol 50% e NaOH 2M - relação S:L 1:10 - agitado a 200 rpm por 72 horas a 25°C (Sewalt *et al.*, 1997)
AS	Seqüência de 4 etapas de lavagem NaOH 0,5M - 10 min – T. ambiente
BS	Seqüência de 4 etapas de lavagem NaOH 0,1M - 10 min – T. ambiente
HS	Seqüência de 4 etapas de lavagem NaOH 1M - 10 min – T. ambiente
CL	*Celulignina* sem pré-tratamento

Depois do processo de deslignificação, a *celulignina* pré-tratada foi lavada até alcançar um pH de 5,5, e finalmente seca a 50°C por um período de 24 horas.

4.6. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA. As hidrólises enzimáticas para a avaliação das deslignificações e os preparados enzimáticos, foram realizadas em triplicata, a uma temperatura de 50°C, meio tamponado com citrato de sódio (pH 4,8), uma carga enzimática de 20 FPU/g de *celulignina* tratada empregando uma relação sólido:líquido de 1:15. (Menezes e Aguiar, 2002) Para a otimização da hidrólise enzimática foi realizado um planejamento experimental de 4 fatores em três níveis cada um e 6 repetições do ponto central, cujas condições foram variadas nas faixas especificadas na Tabela 4.5. As variáveis escolhidas como resposta do processo de hidrólise enzimática foram: conversão de celulose em glicose e concentração de glicose (Montgomery, 2001).

Tabela 4.5. Intervalos utilizados para construir o planejamento experimental (3^4) para a otimização da hidrólise enzimática.

Fatores	Nível Inferior (-1)	Nível Intermediário (0)	Nível Superior (1)
Temperatura (°C)	30	40	50
pH	5,0	5,5	6,0
Carga Enzimática (FPU/g)	5,0	17,5	30
% Sólido (g/100mL)	2	6	10

4.7. PREPARADOS ENZIMÁTICOS. Três preparados comerciais de celulases foram avaliados, Spezyme®CP e GC220, cedidos pela *Genercor International*, e Celluclast 1.5L FG, cedido pela *Novozymes*. As atividades enzimáticas por mL de preparo foram 153,6 FPU, 104,29 FPU e 130,03

FPU, respectivamente. Na avaliação do desempenho dos consórcios comerciais foram utilizados como parâmetros de comparação a quantidade de glicose e celobiose liberadas no processo de hidrólise enzimática. Amostras de cada experimento foram tomadas após 24 e 48 horas a partir do início da hidrólise enzimática.

4.8. PROCESSO SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*). SSF em Fermentômetros: As corridas foram realizadas em fermentômetros de 500 mL com um volume de trabalho que variou dependendo do objetivo do experimento. A carga enzimática assim como a temperatura da pré-hidrólise foram determinadas pelo resultado da otimização da hidrólise enzimática. A temperatura do processo SSF foi 37°C, temperatura máxima que permite o desenvolvimento da levedura. As demais condições foram avaliadas e determinadas no transcurso da pesquisa.

SSF em Biorreator: As fermentações foram realizadas com células em suspensão (células livres) em um biorreator 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.

As condições de operação do biorreator assim como as empregadas nos fermentômetros foram variáveis de estudo dentro da pesquisa,

estabelecendo um valor a cada condição depois de ser avaliada a sua influência no processo (Dowe & McMillan, 2000). Os três fatores inicialmente avaliados no processo SSF foram: teor de sólido (%Sólido), concentração de inóculo e tempo de pré-hidrólise enzimática (t_{HE}) cada uma variada em dois níveis; estes fatores, assim como seus níveis, estão especificados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Intervalos utilizados para construir o planejamento experimental (2^3) para o processo SSF.

Fatores	Nível Inferior (-1)	Nível Superior (1)
% Sólido (g/100mL)	10	20
Concentração de Inóculo (g/L)	2	6
t_{HE} (horas)	12	18

4.9. AVALIAÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO E SAIS. A literatura sinaliza a importância de suplementar o meio de cultura para fermentação alcoólica com fontes de nitrogênio e alguns oligoelementos com a finalidade de fortalecer a levedura e aumentar sua produtividade (Xiaobo, 2006; Sreekumar, 1999; Danesi *et al.*, 2006). Com base nestas afirmações, o meio do SSF foi suplementado com uma fonte de nitrogênio e uma solução de sais e acido cítrico como oligoelementos necessários para melhorar o desempenho da levedura. As fontes de nitrogênio selecionadas foram: extrato de levedura, uréia e sulfato de amônio. Estas fontes foram avaliadas separadamente ou combinadas com uma solução de sais e acido cítrico recomendada para leveduras (Du

Perez *et al.*, 1985). A composição desta solução foi apresentada na Tabela 4.3. As concentrações avaliadas para cada fonte de nitrogênio foi 3 g/L e para a solução de sais e ácido cítrico 40 mL/L. A matriz de experimentos gerada para estas avaliações é apresentada na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Suplementação do meio de cultura no processo SSF

Suplemento
Sem Suplementos
Sais
Extrato de Levedura
Uréia
Sulfato de Amônio
Sais + Extrato de Levedura
Sais + Uréia
Sais + Sulfato de Amônio

4.10. ESTUDO DA ADIÇÃO DA ENZIMA β-GLUCOSIDASE NO PROCESSO SSF. Diferentes trabalhos da literatura sugerem a adição da enzima β-glucosidase para aumentar o desempenho do processo de hidrólise enzimática para a liberação de glicose (Mais *et al.* 2002; Menezes e Aguiar, 2002; Pan *et al.*, 2005). Avaliou-se, então, se a adição da enzima β-glucosidase no meio representaria uma diminuição na carga enzimática do complexo GC220 e um aumento na liberação de glicose do complexo de celulose.

Uma formulação enzimática que hidrólise adequadamente a *celuligninaG* dará uma grande contribuição à economia do processo e ao aproveitamento das enzimas, as quais encontram-se dentro dos insumos de maior custo no processo. Acredita-se que a adição da enzima β-glucosidase ao complexo enzimático (GC220) permite diminuir a

quantidade do complexo empregado e melhorará a hidrólise no processo SSF (Bath & Bath, 1997).

Realizou-se um planejamento fatorial completo de 2 fatores com 2 níveis cada e três repetições do ponto central (Tabela 4.8), o qual permitiu avaliar se a curvatura na variável de resposta representada pelo modelo foi um item importante para ser estudado (Barros Neto *et al.*, 1995; Barros Neto *et al.*, 2001; Rodrigues & Iemma, 2005; Montgomery, 2001).

Os fatores escolhidos neste planejamento experimental foram: a carga enzimática do complexo celulolítico GC220 (*Genencor International*) medida em FPU/g e a carga enzimática da β-glucosidase (*Novozymes*) medida em UI/g. Como variável de resposta foi analisada a concentração de etanol depois de 32 horas de processo.

As condições empregadas para a realização dos experimentos foram: 20% de teor de sólido, 6 g/L de células, 47°C na pré-hidrólise e 37°C no processo SSF.

Tabela 4.8. Matriz do Planejamento Fatorial para Adição de β-glucosidase (2^2)

Exp.	Carga Enzimática de GC 220 (FPU/g)	Carga Enzimática de β-glucosidase (UI/g)
1	10,0	0
2	25,0	0
3	10,0	30
4	25,0	30
5	17,5	15
6	17,5	15
7	17,5	15

4.11. OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO REALIZADO SOBRE A *CELULIGNINA* NO PROCESSO SSF. Em função de discussões apresentadas no trabalho de Schlittler (2006), gerou-se a necessidade de minimizar a porcentagem de NaOH empregado na etapa de deslignificação da *celulignina*. O procedimento a seguir foi uma minimização da porcentagem de NaOH e a relação sólido:liquido empregadas no processo de deslignificação.

Para a diminuição da quantidade de NaOH foram considerados 2 fatores (teor de NaOH e Relação sólido:líquido), em 3 níveis, para permitir gerar uma superfície de resposta, na qual ao se alterar alguns desses fatores consegue-se a redução do NaOH empregado, sem afetar o desempenho do processo SSF. A variável de resposta a analisar foi a concentração de etanol no final do processo SSF. A matriz deste planejamento encontra-se na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Matriz do Planejamento Fatorial para Minimização do NaOH na Deslignificação

Exp.	S:L	%NaOH
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 empregadas na pré-hidrólise foram 47°C, 26 FPU/g do consórcio enzimático GC220 por um tempo de 12 horas. No processo SSF a temperatura foi de 37°C e a concentração inicial de levedura de 6g/L por um tempo de 32 horas.

4.12. AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDO NO PROCESSO SSF. Embora muitos autores reportassem entre 20% e 25%, como concentração máxima de sólido permitida pelo processo (Stenberg *et al*, 1999; Dowe & McMillan, 2000; Linde *et al.*, 2006; Sassner *et al.*, 2006a), este experimento teve o intuito de alcançar patamares de 30% no teor de sólido (300g/L).

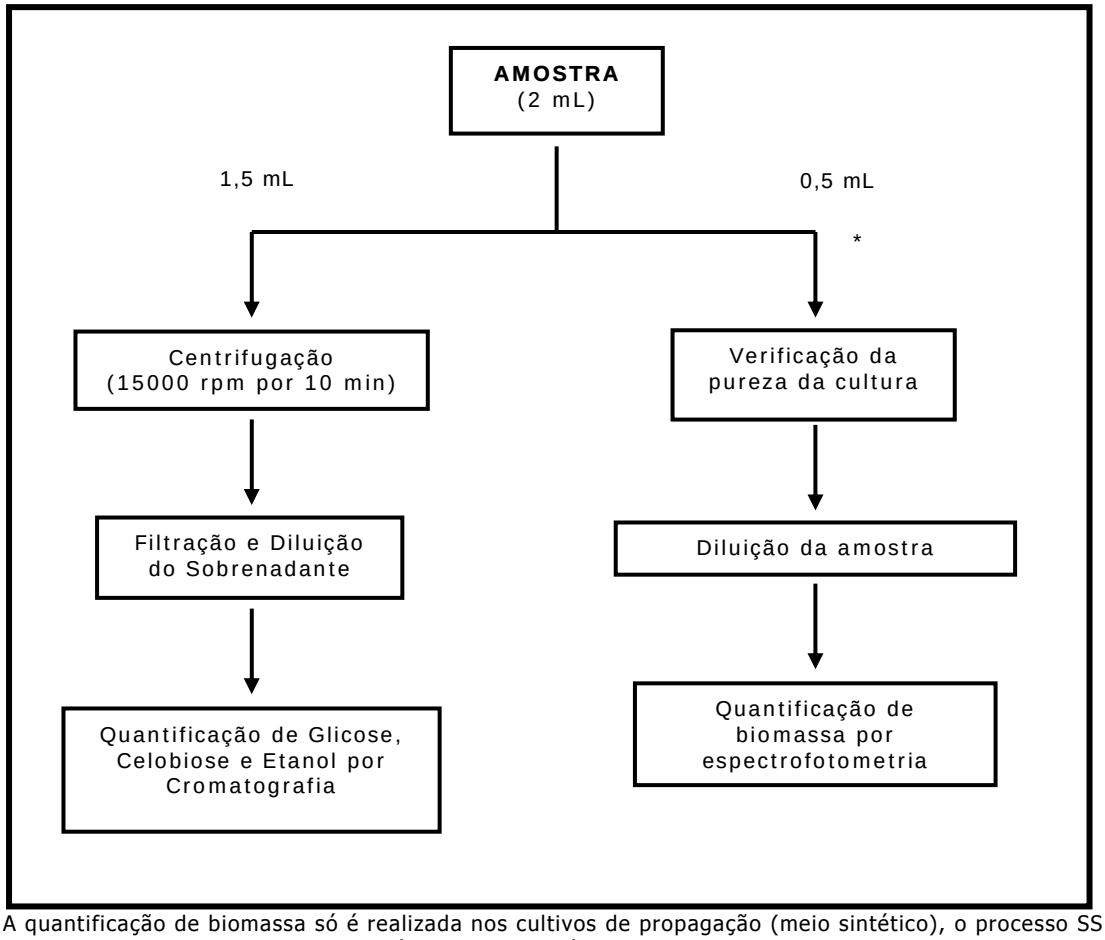
Na pré-hidrólise utilizou-se uma carga enzimática de 26 FPU/g de GC220 e 17 UI/g de β-glucosidase a uma temperatura de 47°C por um tempo de 12 horas, devido à quantidade de sólido empregado. Após o período de pré-hidrólise, o processo SSF foi inoculado com uma concentração inicial de levedura de 6g/L e a temperatura ajustada a 37°C por um tempo de 50 horas.

4.13. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM). As amostras vegetais foram tomadas antes e depois de cada pré-tratamento, e no final do processo SSF. Posteriormente, as amostras foram secas, fixadas em um estambre e submetidas a um recobrimento com partículas de ouro, num sistema a vácuo do tipo BAL-TEC.

As imagens foram adquiridas num microscópio eletrônico Carl Zeiss – DSM 960 pertencente ao laboratório de microscopia do departamento de Materiais e Metalurgia da Pontifícia Universidade Católica (PUC) no Rio de Janeiro.

4.14. METODOLOGIA ANALÍTICA

4.14.1. Amostras: a seqüência de etapas seguidas no tratamento de cada amostra encontra-se esquematizada na Figura 4.1. Devido à cor clara do meio de cultura e às diluições realizadas para quantificação da concentração celular, tornou-se desnecessário incluir na metodologia a separação das leveduras do meio de cultura.



* A quantificação de biomassa só é realizada nos cultivos de propagação (meio sintético), o processo SSF não permite esta quantificação devido à presença de sólidos em suspensão no meio.

Figura 4.1. Representação esquemática do tratamento das amostras

4.14.2. Quantificação Celular: foi determinada pela curva de regressão entre as medidas de absorvância e massa seca de biomassa. As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (SpectrumLab 22pc) em um comprimento de onda de 570 nm. A correlação foi obtida a partir da regressão linear dos pontos, como apresentado na Figura 4.2.

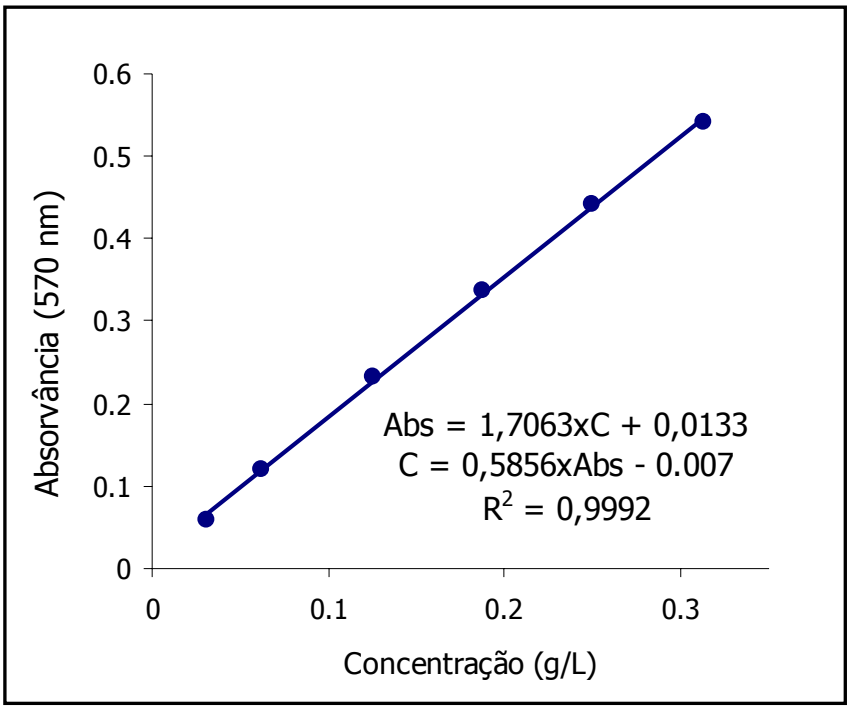


Figura 4.2. Regressão linear e coeficiente de correlação para a quantificação de biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*, λ = 570 nm

4.14.3. Determinação de Metabólitos: glicose, celobiose e etanol foram determinados 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 especificadas na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Condições operacionais do cromatógrafo

Fase móvel: água Milli-Q desgaseificada
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 solução padrão é composta por celobiose, glicose e etanol nas concentrações de 5 g/L, 10 g/L e 15 g/L, respectivamente (Figura 4.3).

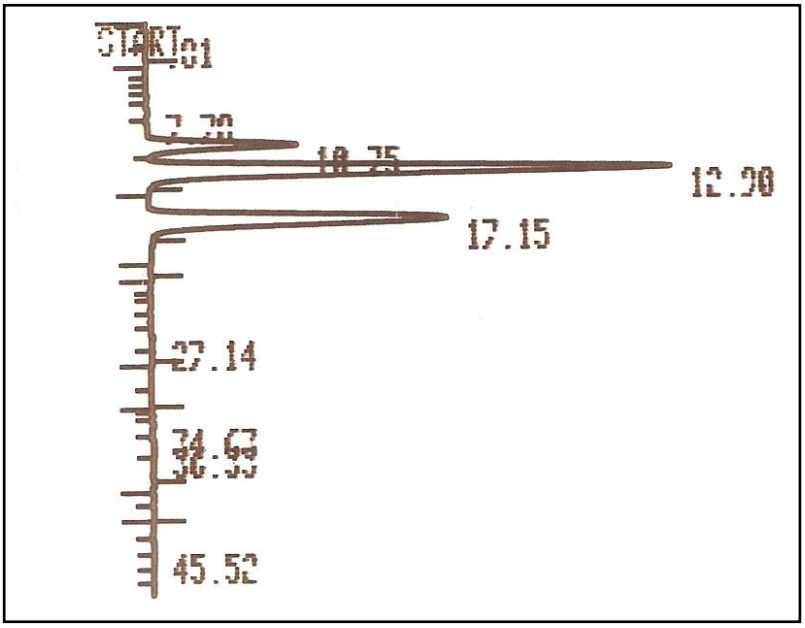


Figura 4.3. Cromatograma da solução padrão (pico de celobiose: 10,75 min, pico de glicose: 12,90 mim, pico de etanol 17,75 min)

As concentrações das substâncias analisadas nas amostras foram calculadas mediante comparação com padrões de concentração

previamente estabelecida, com áreas cromatográficas calculadas pelo mesmo aparelho. A correlação utilizada para o cálculo das concentrações das amostras analisadas foi:

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

As variáveis envolvidas nesta equação foram definidas como: $\mathbf{C_{amostra}}$ a concentração de amostra analisada, $\mathbf{A_{amostra}}$ a área da amostra na análise cromatográfica, $\mathbf{C_{padrão}}$ a concentração conhecida da substância utilizada na solução padrão, $\mathbf{A_{padrão}}$ a área da substância na solução padrão na análise cromatográfica e **D** o fator de diluição realizado na amostra antes da injeção.

4.14.4. Atividade Enzimática: foram quantificadas, para cada enzima, as três atividades enzimáticas características das celulases: FPÁsica, CMCásica e β-glucosidásica. 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). Por sua vez, 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 DISCUSSÕES

5.1. PROCESSOS DE DESLIGNIFICAÇÃO

A celulose é intrinsecamente resistente ao ataque enzimático, além de ser protegida pela matriz de lignina e hemicelulose que a envolvem. O desafio técnico-econômico para a utilização de materiais lignocelulósicos reside em facilitar a atuação das enzimas sobre a celulose contida nestes materiais (Pan *et al.*, 2005).

A imprescindibilidade de pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos é citada na maioria dos trabalhos reportados na literatura (Papatheofanus *et al.*, 1995; Vlasenko *et al.*, 1996; Sewalt *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2002; Menezes e Aguiar, 2002; Varga *et al.*, 2002; Gollapalli *et al.*, 2002; Ferrer *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2005; Pasquini *et al.*, 2005; Moriya *et al.*, 2005, Mosier, 2005; Kurabi *et al.*, 2005; Gidh *et al.*, 2006; Linde *et al.*, 2006; Garcia-Aparicio *et al.*, 2006; Alriksson *et al.*, 2006).

Segundo Eriksson *et al.*, (2002), tem sido notado um melhoramento na atuação das enzimas celulásicas quando a biomassa lignocelulósica é submetida a tratamentos prévios, sejam eles químicos ou termopressurizados, nos quais são retiradas as frações interferentes no processo de hidrólise enzimática. Trabalhos realizados por Pan *et al.* (2005) ressaltam o aumento significativo da digestibilidade enzimática da celulose de biomassas quando são realizados tratamentos alcalinos (peróxido e hidróxidos).

Explosão com vapor é um dos métodos de pré-tratamento mais estudados para a conversão de biomassas. O processo de explosão a vapor utiliza altas temperaturas e mudanças fortes de pressão. A maior parte da hemicelulose é removida neste processo, contribuindo para o aumento da susceptibilidade da celulose ao ataque hidrolítico. Porém, o processo de explosão a vapor não gera modificações sobre a lignina contida na biomassa, pelo contrário, existe um aumento na porcentagem da lignina na composição devido à remoção da hemicelulose da biomassa. Durante a explosão por vapor, a lignina é submetida a reações de condensação que dificultam sua posterior remoção (Pan *et al.*, 2005).

O resíduo utilizado como matéria-prima neste trabalho, resíduo sólido proveniente da hidrólise ácida do bagaço de cana, realizada para a remoção da fração hemicelulósica (Betancur, 2002), é denominado *celulignina*. Este resíduo foi lavado com solução alcalina (NaOH), com o objetivo de retirar os açúcares residuais da hidrólise ácida e aumentar o pH do sólido remanescente. As lavagens realizadas com as soluções alcalinas solubilizaram parte da lignina contida na *celulignina*, conferindo à solução uma cor escura como pode ser observado na Figura 5.1.

Figura 5.1. Lavagem de *celulignina* com solução alcalina

5.1.1. PRÉ-TRATAMENTOS ALCALINOS

Pesquisas desenvolvidas por Sewalt *et al*. (1997) relatam que pré-tratamentos que empregam soluções concentradas de NaOH conseguem aumentar as taxas de sacarificação na hidrólise enzimática. Menezes e Aguiar (2002) indicaram um aumento significativo na digestibilidade da celulose de compostos lignocelulósico, tornando o substrato mais acessível ao ataque das enzimas do complexo celulásico. Segundo Lee *et al.* (1997), o pré-tratamento com NaOH aumenta a exposição da celulose, devido ao efeito deslignificante, melhorando a hidrólise enzimática. Estudos realizados por Yung & Rowell (1986) indicam que

um grau de deslignificação de até 50% gera um aumento na taxa de sacarificação do substrato, mas aumentos maiores na remoção da lignina não apresentam incrementos significativos na taxa de sacarificação.

Nesta primeira etapa do trabalho foram realizados diferentes tratamentos de deslignificação, tendo sido variados: solventes, concentrações, relações sólido:líquido (S:L) e tipos de processos. A eficiência desses processos de deslignificação foi avaliada por meio da hidrólise enzimática do material resultante.

A idéia de avaliar as lavagens em meio alcalino, em diferentes etapas e concentrações como método de deslignificação, surgem ao se tencionar neutralizar a *celulignina* proveniente do processo de hidrólise ácida. Neste processo, ao se lavar o sólido em meios alcalinos foi possível solubilizar substâncias da *celulignina* que tornavam o líquido marrom. Realizou-se uma análise espectrofotométrica para verificar a existência dos picos característicos da lignina na faixa do ultravioleta, confirmando a remoção de alguns compostos do complexo da lignina.

Pré-tratamentos Alcalinos em 1 etapa (A, B e H): Os pré-tratamentos alcalinos em uma etapa consistiram em submergir a *celulignina* em uma solução de NaOH (os ensaios foram realizados em diferentes concentrações 1M, 0,5M e 0,1M), por um tempo de 20 min, utilizando uma relação sólido:líquido de 1:20.

A intensidade na coloração do sobrenadante de cada tratamento tornava-se mais escura quando a concentração de NaOH aumentava. Em cada sobrenadante foram lidos espectros de absorvância (Figura 5.2), nos quais foi possível observar a similaridade entre os espectros e a diminuição do valor da absorvância quando a concentração do hidróxido

de sódio diminuía, o que poderia ser interpretado como uma diminuição da concentração de substâncias decorrentes da lignina, dissolvidas no meio alcalino.

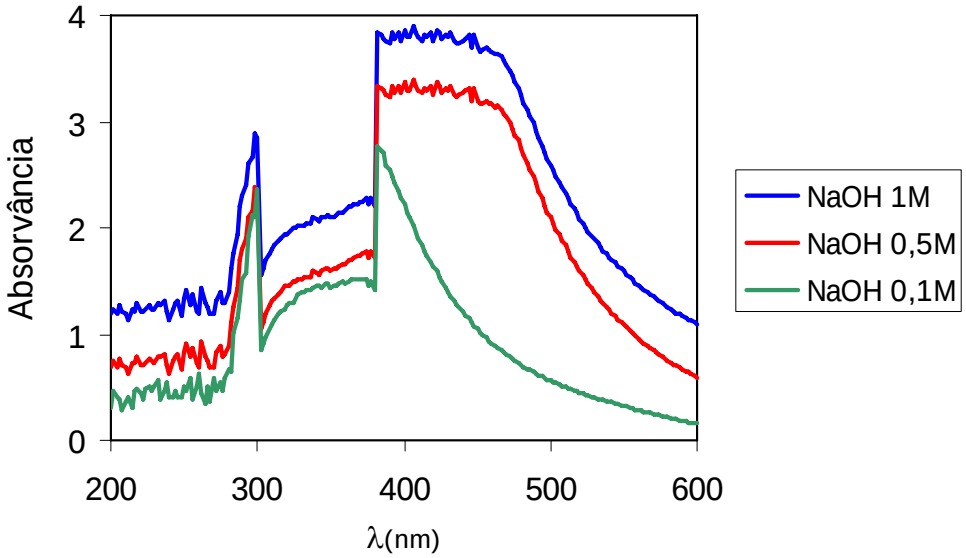


Figura 5.2. Espectros de absorvância para os diferentes pré-tratamentos alcalinos em uma etapa

Na Figura 5.3 são apresentados os sólidos residuais de cada pré-tratamento. Para os pré-tratamentos realizados em uma única etapa a diferença na coloração é muito sutil. Porém, pode se observar uma tonalidade mais clara no sólido que foi tratado com a maior concentração de NaOH (Figura 5.3c). O que concorda com um aumento nos valores da absorvância para o líquido extraído ao ser utilizada a maior concentração de NaOH (1M).

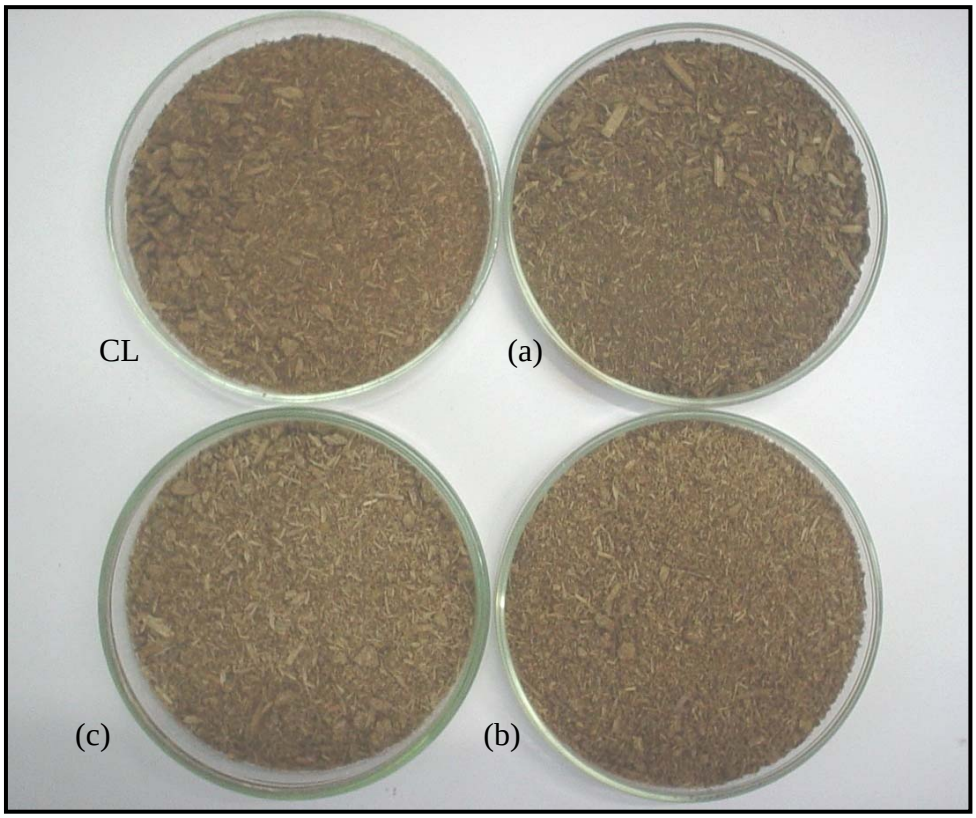


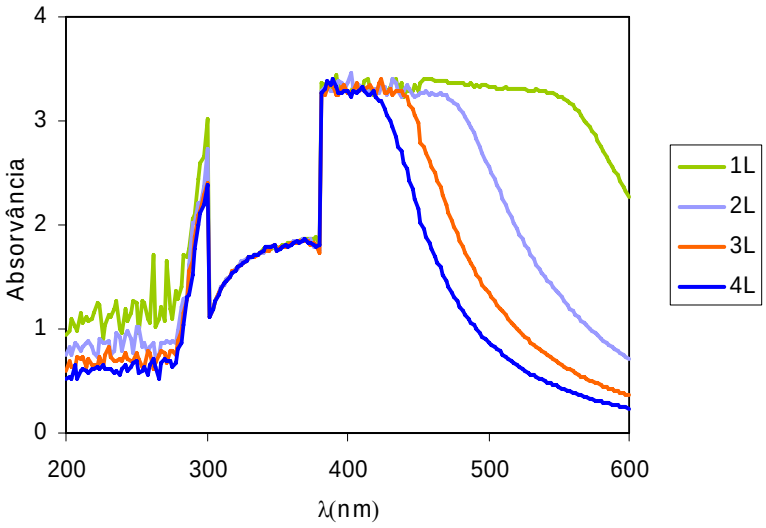
Figura 5.3. CL – *Celulignina*; **(a)** Resíduo sólido do pré-tratamento com NaOH 0,1M; **(b)** Resíduo sólido do pré-tratamento com NaOH 0,5M; **(c)** Resíduo sólido do pré-tratamento com NaOH 1M

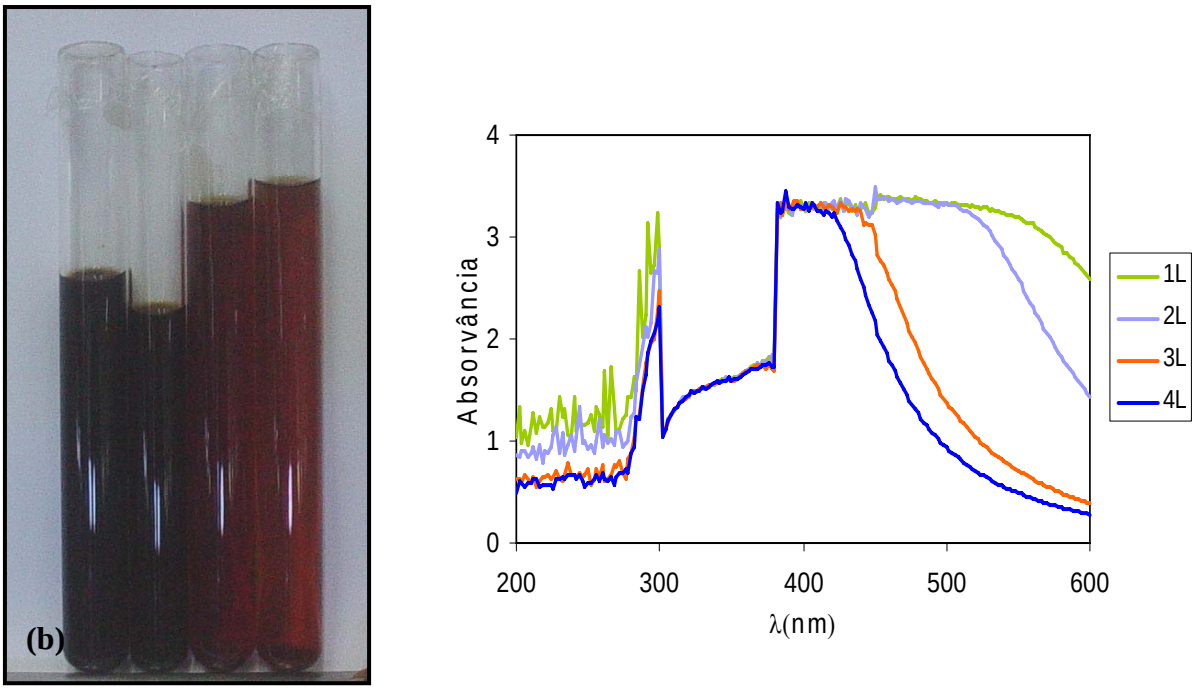
Pré-tratamentos Alcalinos em 4 etapas (AS, BS e HS): O pré-tratamento foi realizado em 4 etapas, partindo-se de *celulignina* lavada com H_2O destilada para remover a xilose residual, ainda presente nas fibras. A *celulignina* foi submetida a 4 lavagens seqüenciais com uma solução de NaOH (1M, 0,5M e 0,1M, segundo as condições do ensaio) em uma relação S:L de 1:4 a temperatura ambiente. Finalmente a fração sólida foi seca a 60°C por 12 a 16 horas.

A Figura 5.4 corresponde ao conjunto de amostras da fração líquida obtida em cada etapa do pré-tratamento. Em cada imagem é

apresentada uma amostra do líquido residual de cada lavagem para as diferentes concentrações de NaOH avaliadas (1M, 0,5M e 0,1M). As amostras foram dispostas na ordem de obtenção, isto é, para cada imagem a amostra do lado esquerdo corresponde à primeira lavagem, e assim sucessivamente.

Os espectros de absorvância gerados pela água residual das lavagens com soluções alcalinas apresentam um comportamento particular para comprimentos de onda acima de 430 nm. O aumento na inclinação das linhas espectrais, depois de 430 nm, coincidiu com a seqüência das lavagens, sugerindo uma diminuição na concentração das substâncias que foram retiradas da *celulignina* em cada lavagem.





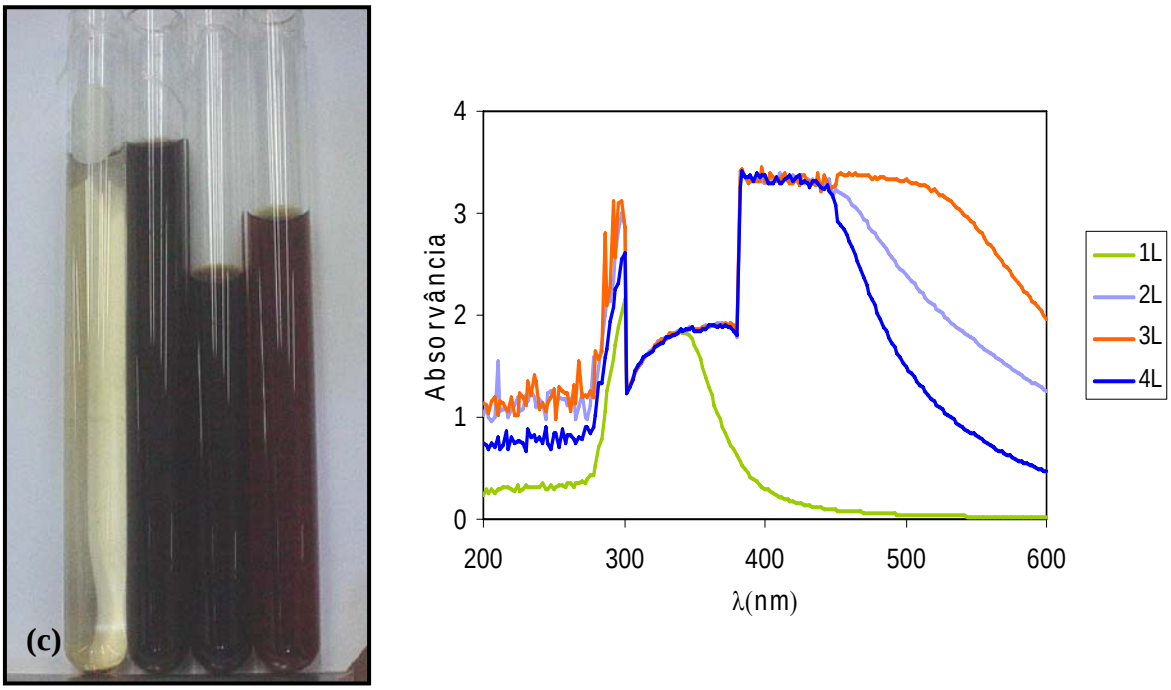


Figura 5.4. Amostras da fração líquida de cada etapa do pré-tratamento para diferentes concentrações de NaOH e seus correspondentes espectros de absorvância para cada lavagem da seqüência; **(a)** NaOH = 1M **(b)** NaOH = 0,5M e **(c)** NaOH = 0,1M

Nas lavagens realizadas com as concentrações 1M e 0,5M (Figura 5.4 a e b) foi possível observar como a cada lavagem a intensidade da cor diminui, sugerindo uma diminuição na concentração das substâncias extraídas. A baixa concentração utilizada no pré-tratamento da Figura 5.4c não permitiu a elevação do pH suficientemente para produzir uma solubilização das substâncias provenientes da lignina; no entanto, após a segunda lavagem a alcalinidade conseguiu extrair algumas substâncias, mas o máximo de extração ocorre na terceira lavagem e a coloração começou a diminuir intensidade só na quarta lavagem.

A diminuição da coloração nos líquidos residuais dos 3 processos de deslignificação esteve de acordo com a diminuição da intensidade de cor apresentada nos espectros de absorvância realizados para cada amostra do líquido residual, como é observado na Figura 5.4. Embora estes espectros apresentassem ruído elevado, foi possível observar o pico característico dos compostos fenólicos típicos da lignina e dos seus compostos de degradação, em um valor de comprimento de onda de 280 nm. Estes perfis não foram empregados como uma medida quantitativa da lignina, mas sim como uma indicação qualitativa da diminuição dos compostos polifenólicos extraídos da *celulignina*. Os perfis encontrados concordam com perfis reportados por outros autores, validando o conceito de se retirar parte da lignina presente na *celulignina* (D'Almeida, 1988; Fukushima e Savioli, 2001; Björklund *et al.*, 2002; Sewalt *et al.*, 1997) visando aumentar a acessibilidade das enzimas à celulose.

Os sólidos obtidos depois de cada seqüência de lavagens foram apresentados em um quadro comparativo com a *celulignina* sem tratamento (Figura 5.5). A diferença na coloração dos sólidos é evidente, e está de acordo com a concentração de NaOH utilizada em cada lavagem. A coloração escura no sólido resultante das lavagens com a

menor concentração de hidróxido de sódio (Figura 5.3.a) pode estar associada a uma desorganização da macromolécula de lignina; no entanto, devido à baixa alcalinidade da solução, não foi possível a remoção destas porções fenólicas da superfície das fibras.

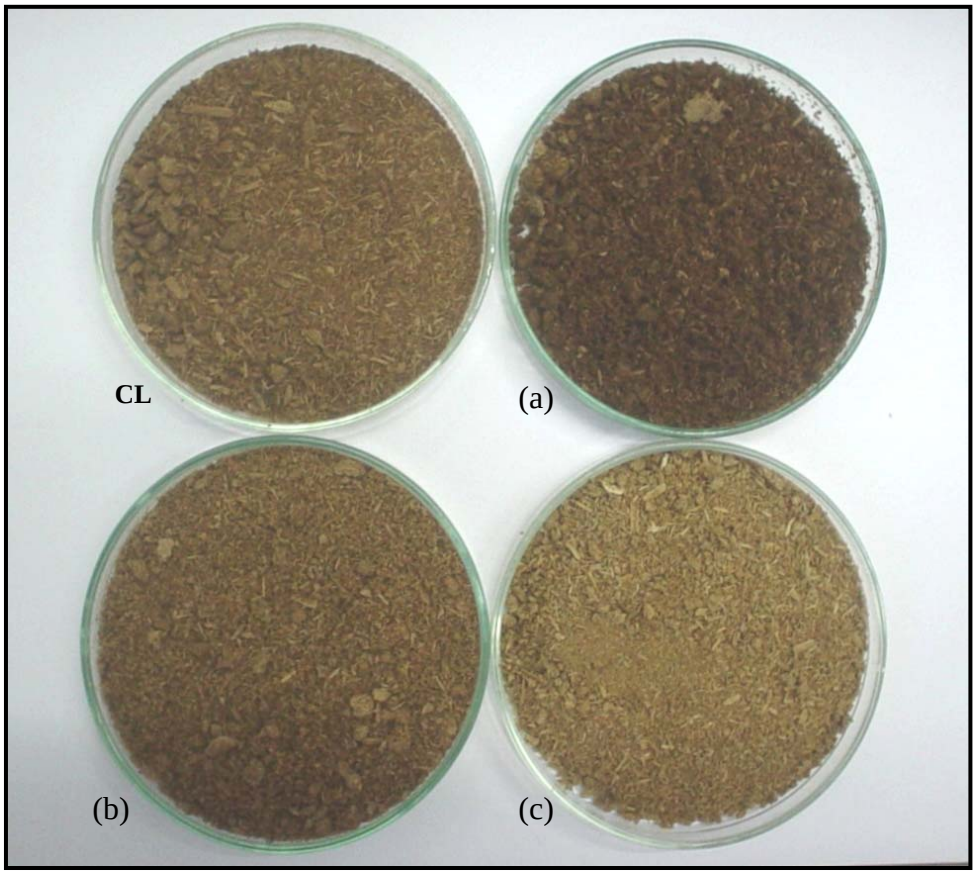


Figura 5.5. CL – *Celulignina*; **(a)** Resíduo sólido do pré-tratamento seqüencial com NaOH 0,1M; **(b)** Resíduo sólido do pré-tratamento seqüencial com NaOH 0,5M; **(c)** Resíduo sólido do pré-tratamento seqüencial com NaOH 1M

Pré-tratamentos Alcalinos com Aumento de Temperatura (E1 e E2): De acordo com a literatura, a temperatura é um fator importante para a remoção das frações da lignina (Sewalt *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 2005; Garcia-Aparicio *et al.*, 2006; Mosier, 2005). Com o intuito de melhorar a remoção da lignina nos pré-tratamentos alcalinos a temperatura ambiente (pré-tratamentos alcalinos B e C) e diminuir a

carga de NaOH utilizada, foram avaliadas somente duas concentrações de NaOH (0,1M e 0,5M) na mesma relação sólido:líquido de 1:20, mas, deixando em repouso a uma temperatura de 70°C por 20 min. O aumento da temperatura neste pré-tratamento não gerou uma melhor remoção com respeito àquelas realizadas a temperatura ambiente, como será visto na avaliação da hidrólise enzimática. Porém, foram removidas substâncias provenientes da lignina, como pode ser notado de uma maneira qualitativa nos espectros das figuras 5.6 e 5.7.

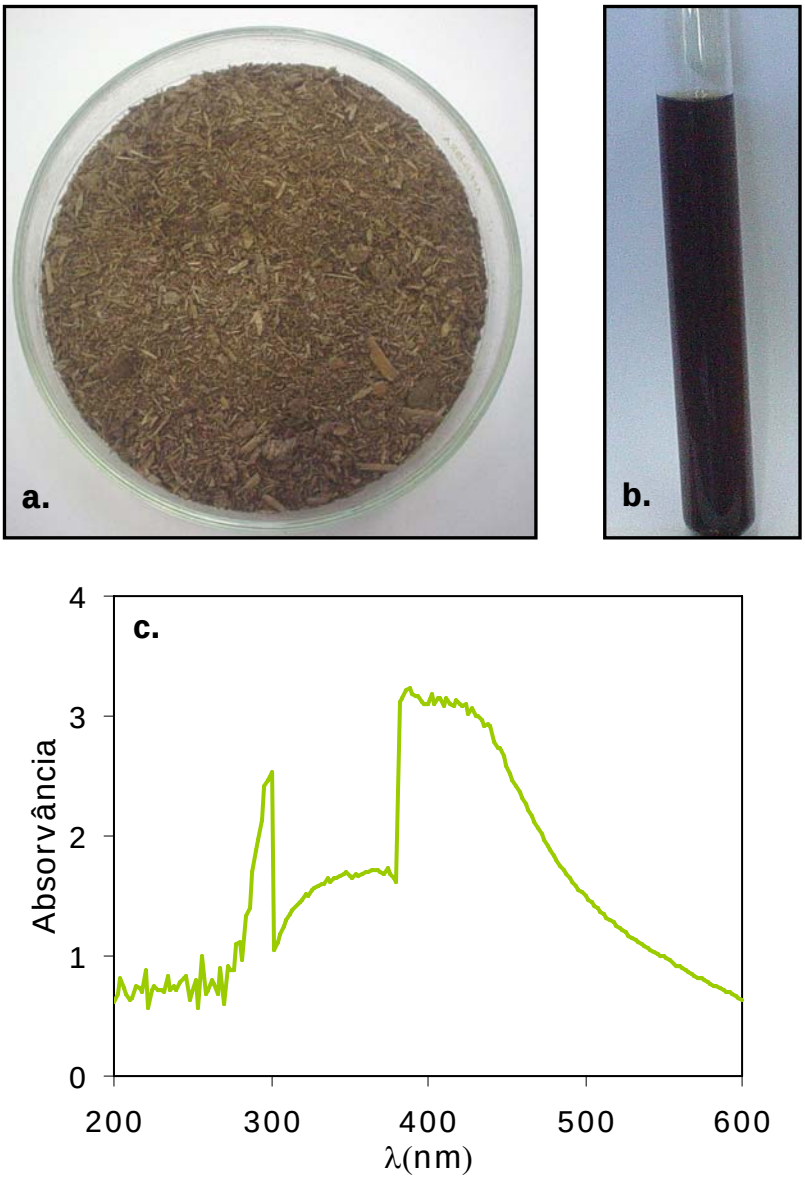


Figura 5.6. (a) Resíduo sólido do pré-tratamento com NaOH 0,1M a 70°C por 20 min.; **(b)** Resíduo líquido; **(c)** Espectro de absorvância

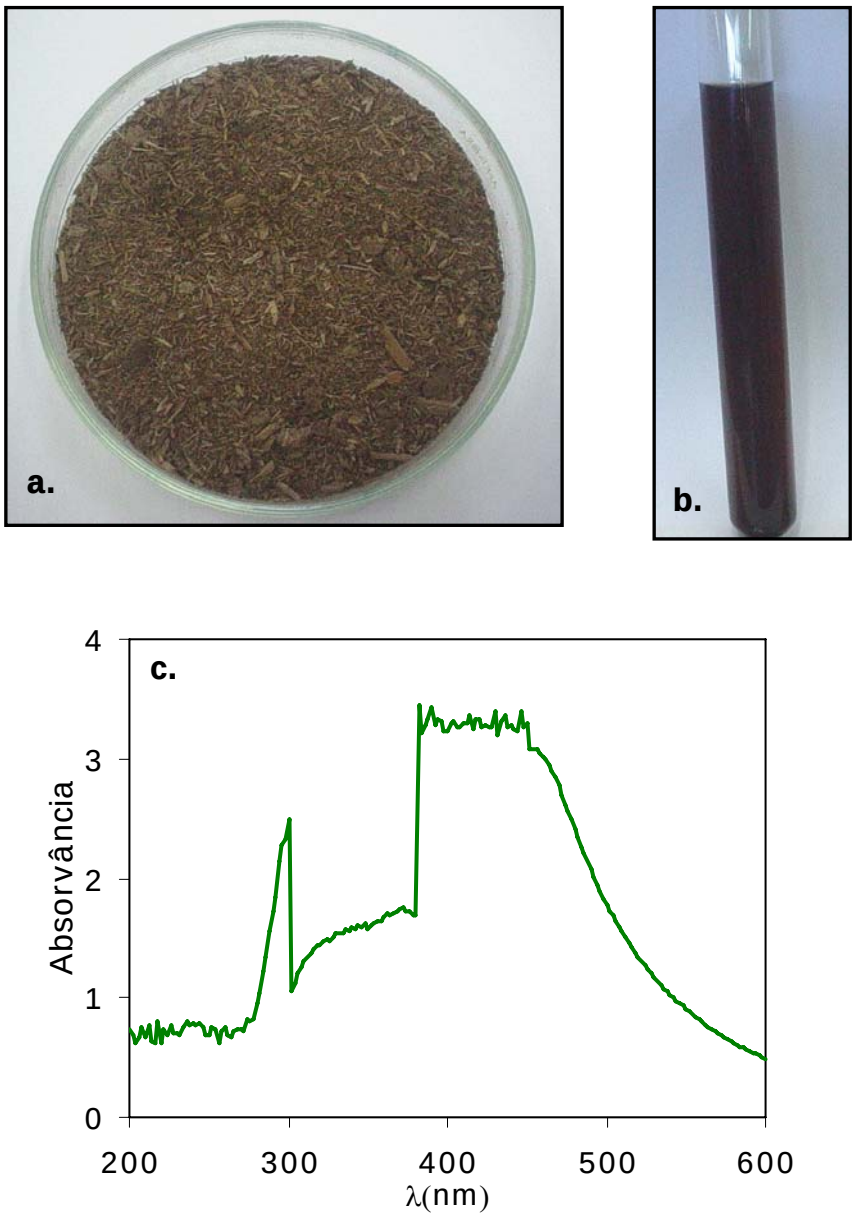


Figura 5.7. (a) Resíduo sólido do pré-tratamento com NaOH 0,5M a 70°C por 20 min.; **(b)** Resíduo líquido; **(c)** Espectro de absorvância

Pré-tratamento com NaOH 4% (G): Um pré-tratamento termo-pressurizado foi realizado sobre a *celulignina* em contato com uma solução de hidróxido de sódio 1M (4% m/v) (121°C por 30 min), como proposto pos Menezes e Aguiar (2002). Os resultados qualitativos como

a tonalidade da solução obtida e o espectro de absorvâncias, as quais apresentam um comportamento típico de solubilização de substâncias da lignina, são apresentados na Figura 5.8. O líquido resultante neste pré-tratamento apresentou uma tonalidade escura, e no espectro de absorvância possui os picos característicos da lignina na região UV assim como o comportamento típico na região do visível.

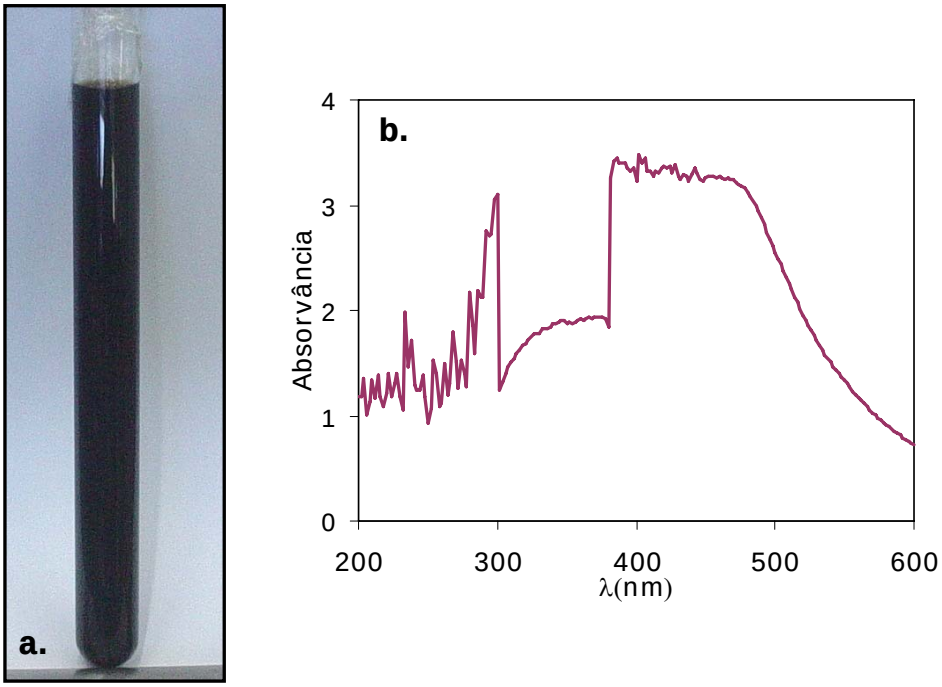


Figura 5.8. (a) Resíduo líquido do pré-tratamento com NaOH 4% (m/v); **(b)** Espectro de absorvância

Pré-Tratamento Álcool-Alcalino (K): Para este pré-tratamento foi utilizada uma solução 50% (v/v) de etanol com uma concentração 0,2M de NaOH, e uma relação sólido:líquido de 1:10, como indicado por Sewalt *et al.* (1997). A mistura foi incubada em *shaker* a uma temperatura de 25°C por um período de 72 horas a 200 rpm. A seguir, o

sólido foi lavado e seco a 55°C até peso constante. O resultado deste pré-tratamento foi um líquido escuro que apresentou os picos característicos da lignina na região UV assim como o comportamento típico na região do visível (Figura 5.9).

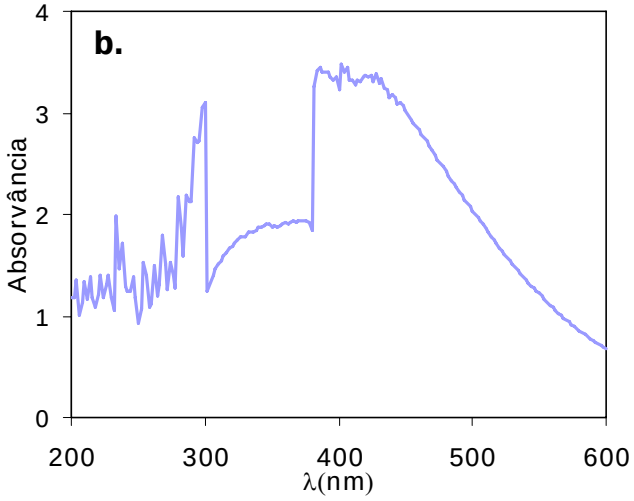


Figura 5.9. (a) Resíduo líquido do pré-tratamento álcool-alcalino; **(b)** Espectro de absorvância

Pré-tratamento Alcalino em 9 etapas (I): Esta seqüência de lavagens foi realizada em várias etapas com uma solução alcalina de concentração 0,5M de NaOH e uma relação S:L 1:4. O Objetivo deste pré-tratamento foi determinar a quantidade de etapas necessárias para que todas as substâncias possíveis de se extrair, as quais tornavam o líquido com uma coloração marrom, fossem removidas. A coloração do líquido foi suficientemente clara para determinar que as 9 etapas retirariam a maior parte das substâncias solúveis no líquido alcalino. A Figura 5.10 apresenta as diferentes tonalidades obtidas em cada uma das etapas, as quais,

qualitativamente estão de acordo com os espectros obtidos para diferentes comprimentos de onda, ou seja, o líquido mais escuro coincide como o espectro de maior absorvância e o mais claro com o de menor absorvância.

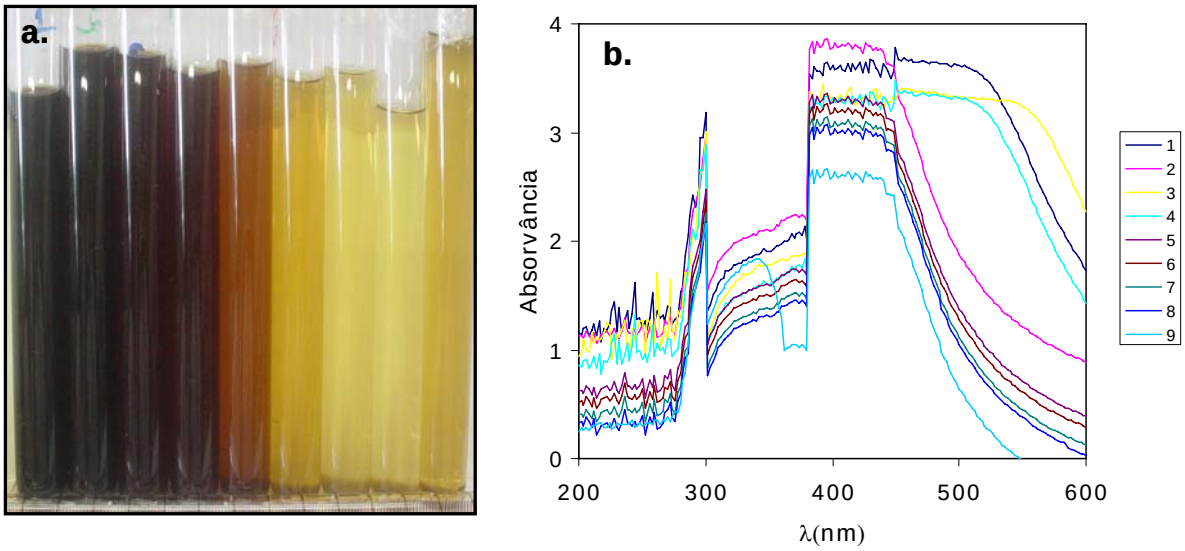


Figura 5.10. (a) Resíduo líquido do pré-tratamento alcalino em 9 etapas; **(b)** Espectro de absorvância

5.1.2. PRÉ-TRATAMENTOS ÁCIDOS

Solvatação da Lignina (F): Após o pré-tratamento ácido, a matriz sólida residual foi submetida a uma segunda etapa para uma deslignificação parcial, como realizado por Papatheofanus *et al.* (1995). Esta segunda etapa consistiu em adicionar à matriz sólida uma solução que continha H_2SO_4 2M e 87% de etanol, em uma relação sólido:líquido de 1:20. Imediatamente após a adição, a suspensão foi levada a refluxo a uma temperatura de 81±2°C por 90 min (Figura 5.11). No final do tratamento, a suspensão foi filtrada e o sólido foi lavado novamente com uma solução com 87% de etanol, para evitar a reprecipitação da lignina

dissolvida sobre as fibras de celulose. Embora o liquido extraído por solvatação em álcool ácido não tenha apresentado uma coloração tão escura como os meios alcalinos, e sim uma coloração marrom. No espectro realizado neste líquido encontraram-se os picos característicos dos compostos da lignina e o perfil característico da região do espectro visível (Figura 5.12).

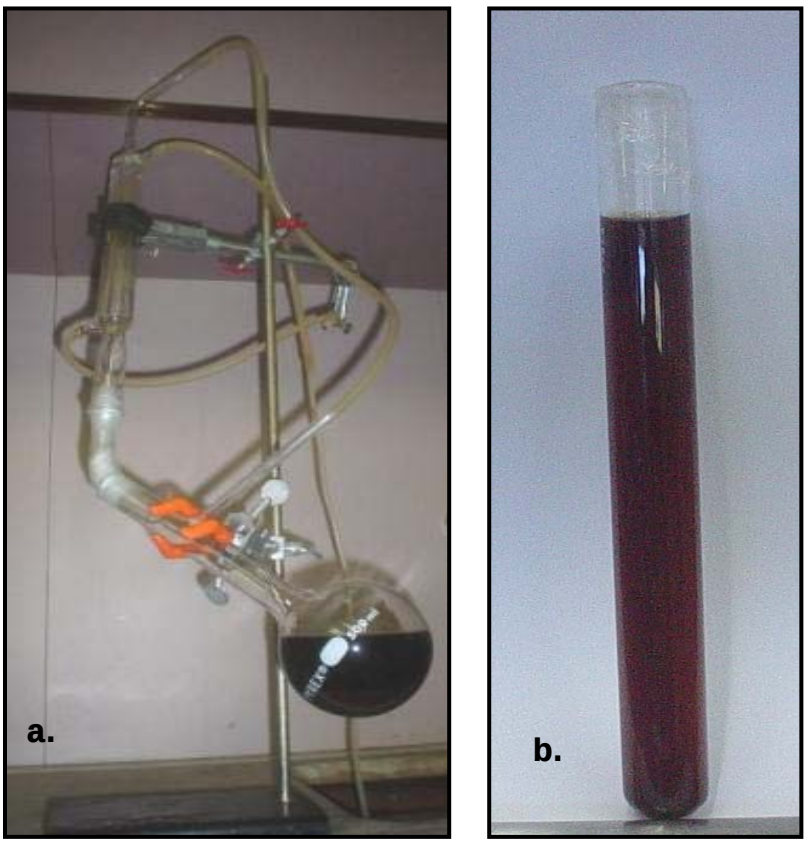


Figura 5.11. (a) Sistema de extração utilizado para o processo de solvatação **(b)** sobrenadante do processo de filtração

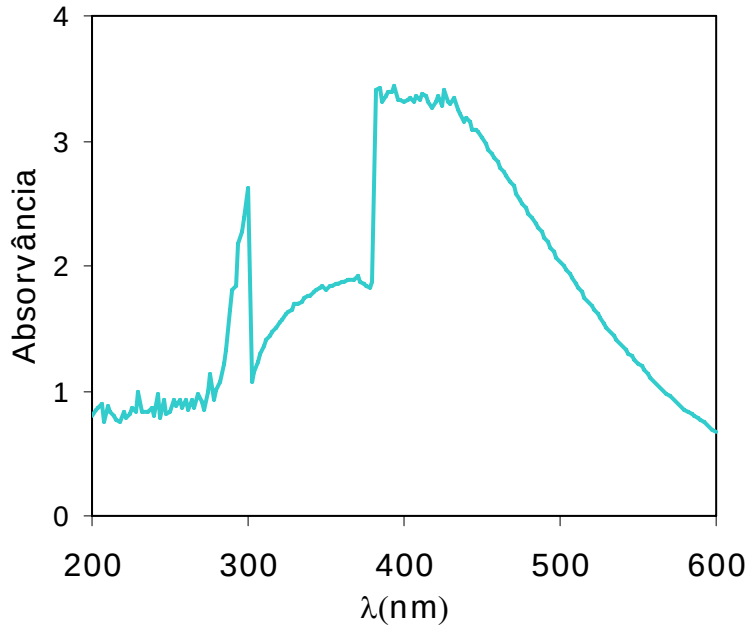


Figura 5.12. Espectro de absorvância do líquido extraído pelo processo de solvatação

Tratamento com Ácido Residual (C): Ao sólido utilizado como matéria-prima, *celulignina*, foi adicionada água em uma relação sólido:líquido de 1:4 e deixada em repouso por 20 min. Este procedimento foi realizado a fim de aproveitar a acidez remanescente no resíduo sólido, *celulignina*, depois do pré-tratamento ácido para a remoção da hemicelulose. Na Figura 5.13 são apresentados o sólido resultante e o líquido obtido do pré-tratamento. É possível notar como o líquido não possui coloração que sugira a presença de compostos derivados da lignina.

Figura 5.13. Sólido e líquido resultante do segundo tratamento ácido residual na *celulignina*

Segundo Tratamento Térmico com Ácido Residual (D): Aproveitando a acidez deixada pela hidrólise ácida na *celulignina*, avaliou-se a adição de água à *celulignina* em uma relação sólido:líquido de 1:4 e realizou-se um tratamento térmico similar ao realizado na hidrólise ácida do bagaço de cana, 121°C por 40 min. Estas condições foram tomadas do trabalho realizado por Betancur (2005) com a intenção de não mudar as condições do primeiro tratamento termo-pressurizado realizado sobre o sólido para a extração da hemicelulose. A Figura 5.14 apresenta o sólido resultante deste tratamento junto ao líquido obtido do pré-tratamento. Como é possível de se observar, o líquido não possui coloração escura que indique a presença de compostos derivados da lignina.

Figura 5.14. Sólido e líquido resultante do segundo tratamento térmico com ácido residual na *celulignina*

5.2. AVALIAÇÃO DOS PRÉ-TRATAMENTOS E DOS PREPARADOS ENZIMÁTICOS COMERCIAIS

As hidrólises enzimáticas foram realizadas com 3 diferentes consórcios enzimáticos comerciais: Spezyme®CP e GC 220 fornecidas pela *Genercor International*, e Celluclast 1.5L FG fornecida pela *Novozymes*.

A hidrólise enzimática foi o parâmetro de avaliação do desempenho de cada um dos consórcios enzimáticos comerciais (Spezyme®CP, GC220 e Celluclast 1.5L FG), que foram empregados nesta pesquisa. As curvas de progresso, utilizando como substrato a *celulignina* sem nenhum tipo de tratamento (Figura 5.15), teve como objetivo avaliar a imprescindibilidade de uma etapa previa de deslignificação, que permita obter concentrações maiores de açúcar, assim como diminuir a ação inibitória da lignina.

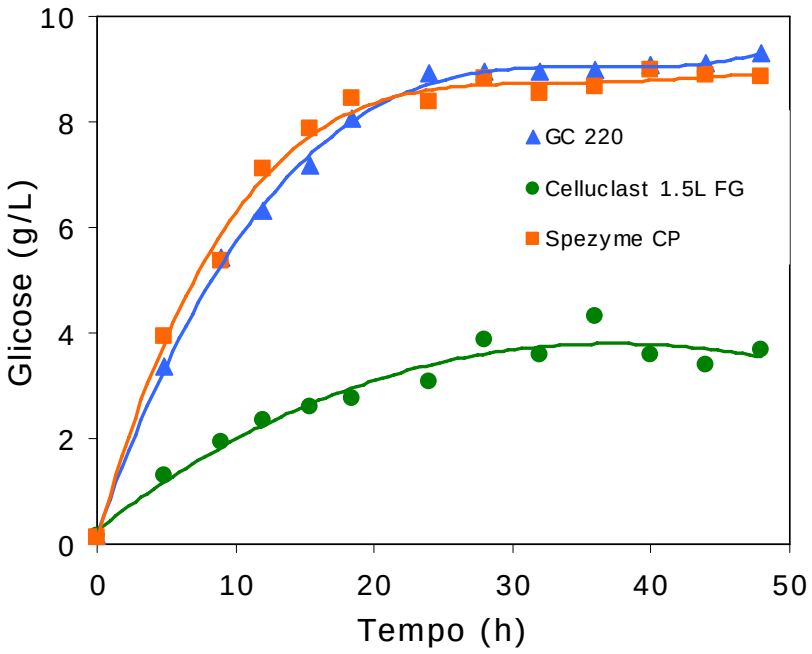


Figura 5.15. Curvas de progresso utilizando como substrato a *celulignina* sem pré-tratamento com os diferentes consórcios enzimáticos comerciais e igual carga enzimática (15FPU/g)

A figura 5.15 permite observar como a lignina interfere de uma maneira marcante sobre o processo de liberação de açúcares por parte das enzimas celulásicas, gerando baixas quantidades de glicose, com valores máximos de 9 g/L.

É importante notar a superioridade no desempenho dos consórcios enzimáticos comerciais Spezyme®CP e GC 220 sobre o consórcio Celluclast 1.5L FG, considerando que foi utilizada a mesma carga enzimática nos três experimentos (20 FPU/g).

Em geral, a maioria dos métodos de deslignificação propõe tratamentos alcalinos, acompanhados ou não, de um tratamento térmico (Papatheofanus *et al.*, 1995; Menezes e Aguiar, 2002; Eriksson *et al.*,

2002; Sewalt *et al.*, 1997). As quantidades liberadas de glicose e celobiose, no processo de hidrólise enzimática, foram os parâmetros de comparação utilizados para avaliar tanto os pré-tratamentos, bem como a eficiência dos diferentes consórcios enzimáticos. Amostras de cada experimento foram retiradas após 24 e 48 horas de hidrólise enzimática. Os resultados das avaliações dos consórcios enzimáticos sobre cada sólido proveniente do tratamento de deslignificação são apresentados nas Figuras 5.16, 5.17 e 5.18.

Avaliando-se os resultados de hidrólise enzimática de *celulignina* submetida a diferentes tratamentos de deslignificação, pode-se deduzir que os tratamentos que geraram um aumento na concentração de glicose na hidrólise enzimática são os que foram propostos por Menezes e Aguiar (2002) e Sewalt *et al.* (1997), codificados como G e K, respectivamente.

Ao se hidrolisar o sólido residual proveniente do pré-tratamento G (Menezes e Aguiar, 2002) com o consórcio enzimático *Spezyme®CP*, a quantidade de glicose liberada aumentou 3,05 vezes e do pré-tratamento K (Sewalt *et al.*, 1997) 2,61 vezes, comparados com a glicose liberada na hidrólise enzimática da *celulignina* sem nenhum tratamento, depois de 48 horas de hidrólise enzimática.

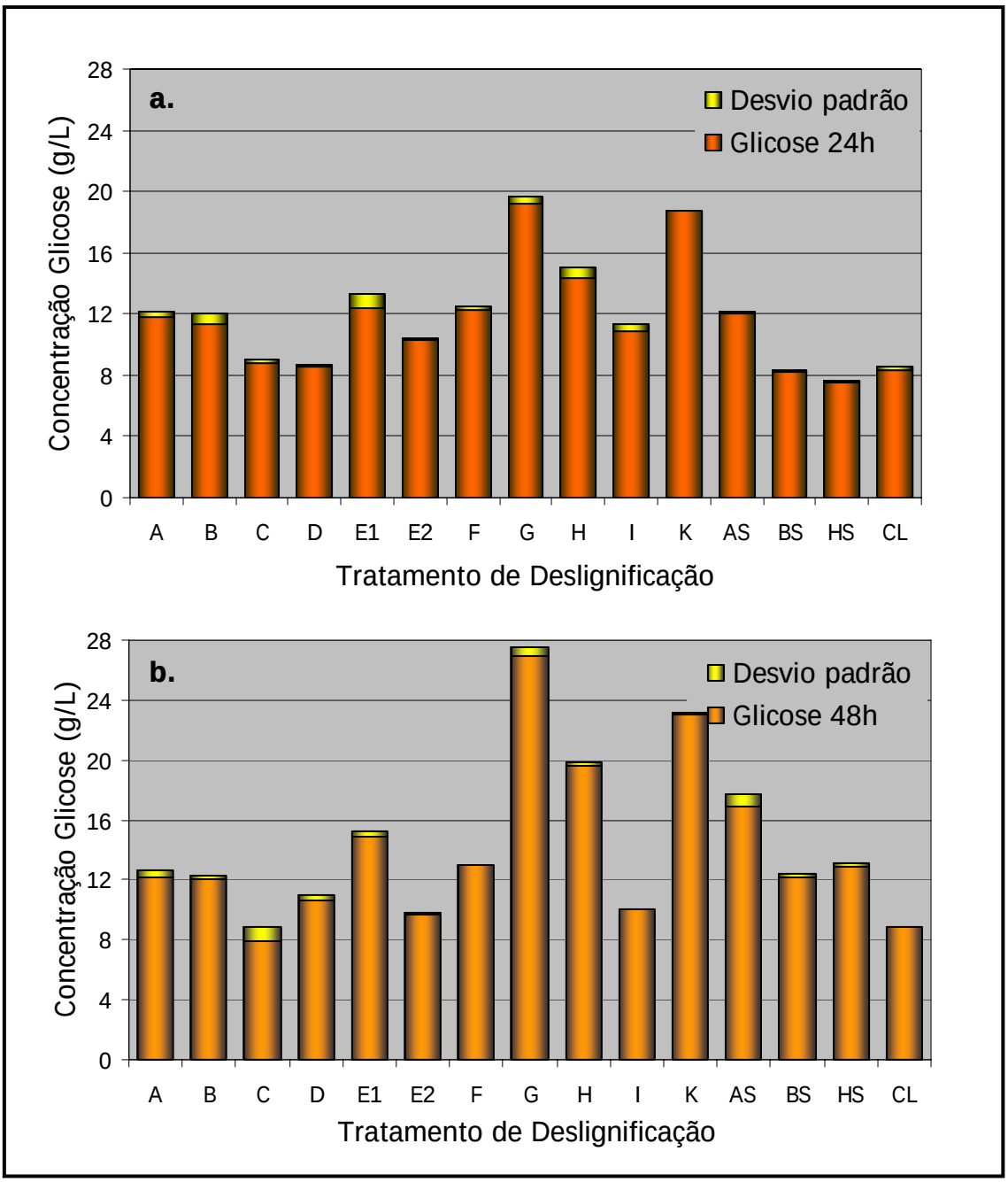


Figura 5.16. Concentrações de glicose após 24 **(a)** e 48 **(b)** horas de hidrólise enzimática com o complexo **Spezyme®CP** (*Genencor International*), em condições de hidrólise de 50°C, pH 4,8, 20 FPU/g *celulignina* tratada e uma relação sólido:líquido 1:15.

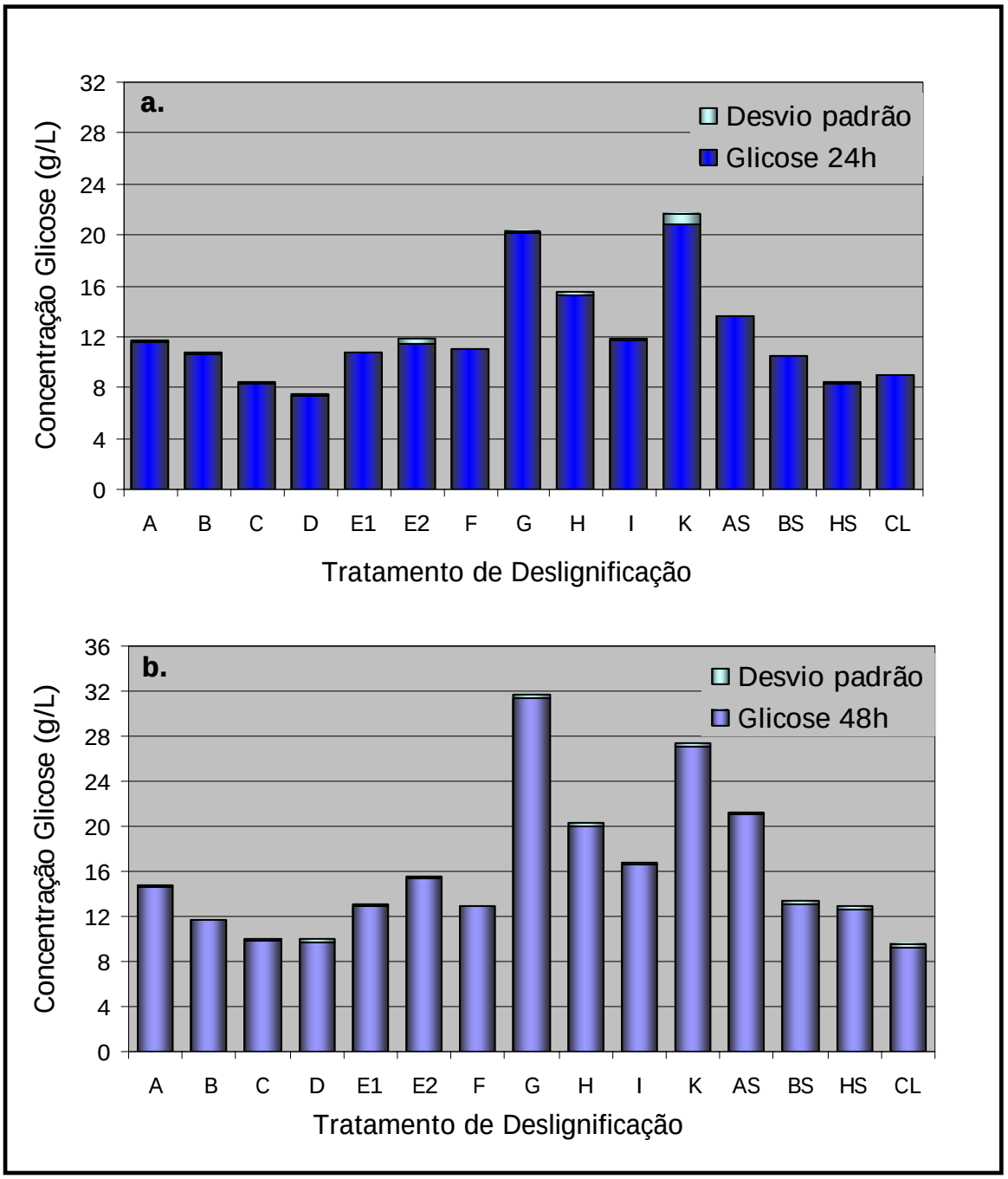


Figura 5.17. Concentrações de glicose após 24 **(a)** e 48 **(b)** horas de hidrólise enzimática com o complexo **GC220** (*Genencor International*), em condições de hidrólise de 50°C, pH 4,8, 20 FPU/g *celulignina* tratada e uma relação sólido:líquido 1:15.

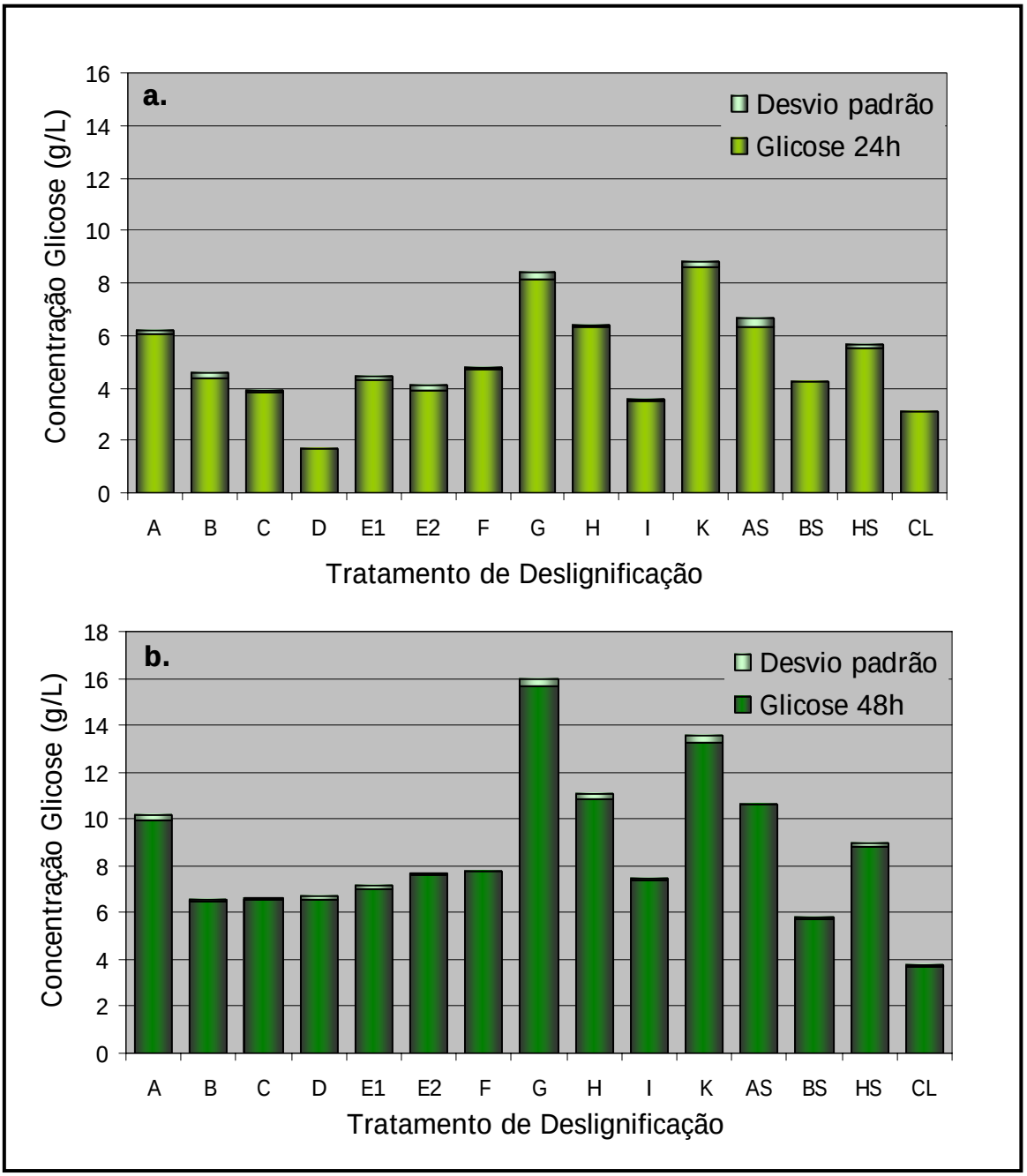


Figura 5.18. Concentrações de glicose após 24 **(a)** e 48 **(b)** horas de hidrólise enzimática com o complexo **Celluclast 1.5L FG** (*Novozymes*), em condições de hidrólise de 50°C, pH 4,8, 20 FPU/g *celulignina* tratada e uma relação sólido:líquido 1:15.

O consórcio enzimático Celluclast 1.5L FG apresentou os maiores aumentos de glicose liberada ao ser comparada com a hidrólise enzimática da *celulignina* sem nenhum pré-tratamento. O pré-tratamento

codificado como G, aumentou em 4,24 vezes a liberação de glicose, e o codificado como K, 3,58 vezes. Ao ser aplicado na hidrólise enzimática o consórcio enzimático GC220, o tratamento denominado G gerou um aumento de 3,37 vezes na concentração de glicose no meio hidrolisado e o tratamento K 2,91 vezes na concentração, ao ser comparada com a concentração de glicose no meio hidrolisado com a *celulignina* sem ser tratada.

Este conjunto de experimentos permitiu observar o desempenho de cada complexo enzimático comercial (Spezyme®CP, GC 220 e Celluclast 1.5L FG) sobre cada um dos pré-tratamentos (deslignificações) avaliados para a remoção e/ou desorganização da lignina presente na *celulignina*. Baseando-se nos resultados discutidos anteriormente foram escolhidos o pré-tratamento de deslignificação e o consórcio enzimático comercial a ser utilizados nas etapas posteriores desta pesquisa. Selecionaram-se o consórcio enzimático GC220 da *Genencor International* e o pré-tratamento de deslignificação utilizado por Menezes e Aguiar (2002), no qual foi utilizada uma solução 4% de NaOH (1M), uma relação sólido:líquido 1:20 e 121°C por 30 min; como condições a serem aplicados posteriormente.

5.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM)

Para corroborar as possíveis mudanças físicas nas fibras lignocelulósicas, após cada tratamento realizado sobre o bagaço de cana-de-açúcar, foram realizadas microscopias eletrônicas de varredura (SEM) dos sólidos obtidos em cada etapa.

No caso de pré-tratamento ácido, a Figura 5.19 ressalta a desorganização das fibras do sólido residual ao ser removida a fração hemicelulósica, quando comparadas com aquelas do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Na micrografia da Figura 5.19a, as fibras são compactas e homogêneas, enquanto na micrografia da Figura 5.19b, pode-se observar a "escamação" das fibras provocada pelo pré-tratamento ácido.

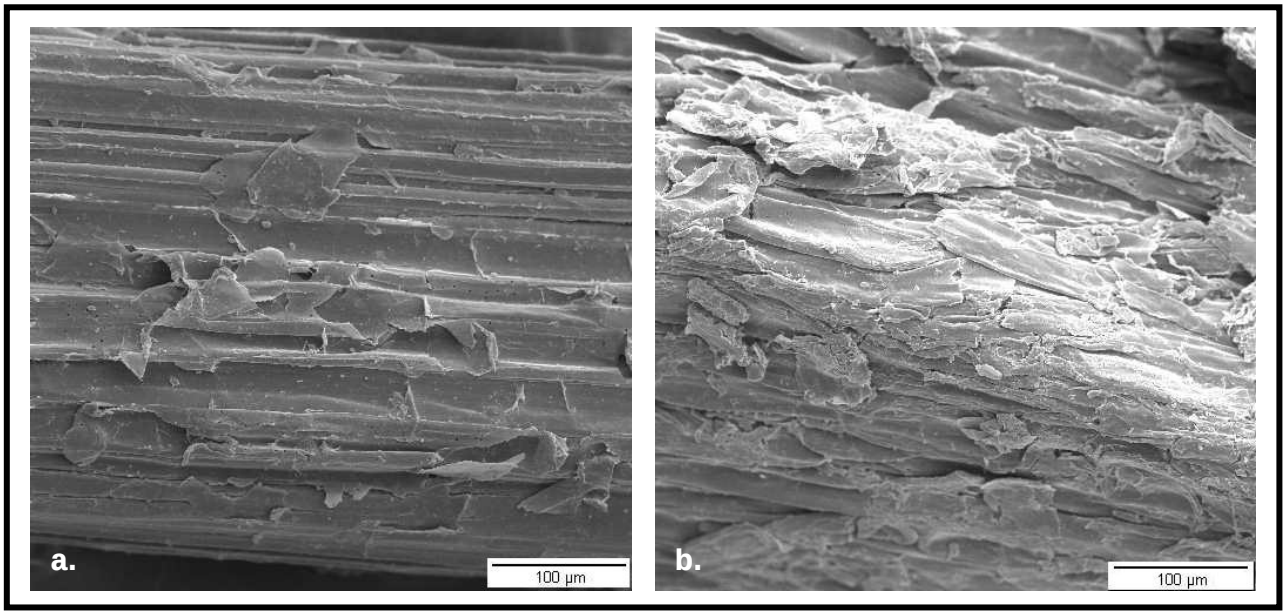


Figura 5.19. (a) Microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar **(b)** Microscopia eletrônica de varredura da *celulignina*

Nas micrografias da Figura 5.20, ilustra-se a desorganização das fibras após cada um dos pré-tratamentos nos quais são removidas a fração hemicelulósica e, parcialmente, a lignina. Com os pré-tratamentos alcalinos se provoca uma desorganização maior, deixando as fibras de celulose mais expostas e acessíveis ao posterior ataque enzimático.

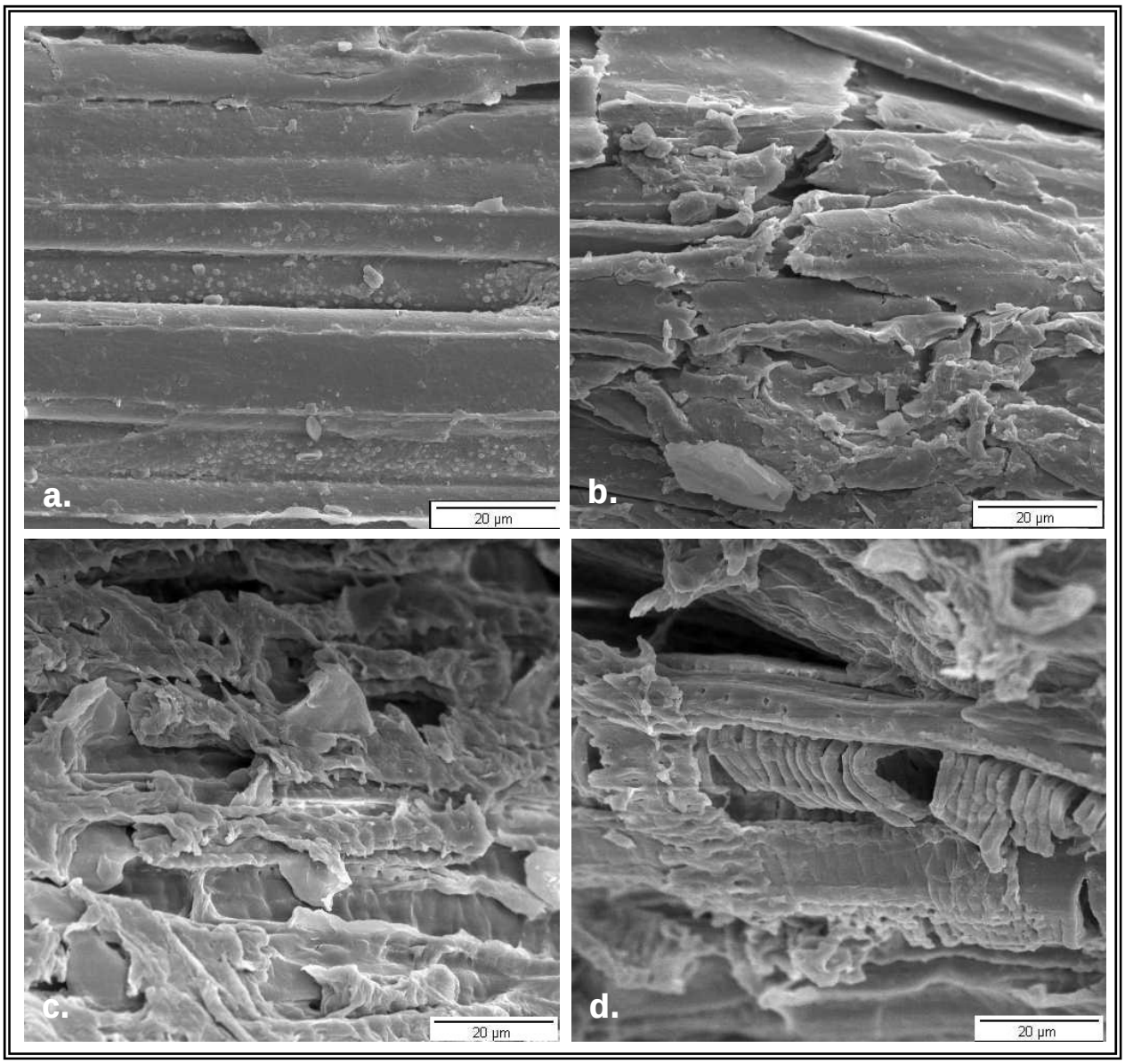


Figura 5.20. Microscopia eletrônica de varredura **(a)** bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, **(b)** *celulignina*, **(c)** resíduo sólido oriundo do pré-tratamento "G", **(d)** resíduo sólido oriundo do pré-tratamento "K"

Em cada micrografia é possível observar mudanças físicas das fibras ao serem submetidas aos diferentes processos. As Figuras 5.20(c) e 5.20(d) exibem as fibras depois dos pré-tratamentos G e K, os quais permitiram que as enzimas tivessem uma maior acessibilidade às fibras de celulose.

A micrografia da Figura 5.21 mostra como ao final do processo SSF as leveduras estão aderidas às fibras, o que dificulta a separação e reutilização das células em fermentações subseqüentes, razão pela qual as concentrações de levedura utilizadas nos processo SSF reportados na literatura são relativamente baixas (Sassner *et al.*, 2007; Alkasrawi *et al.*, 2002; Ballesteros *et al.*, 2006; Öhgren *et al.*, 2007; Dowe & McMillan, 2000).

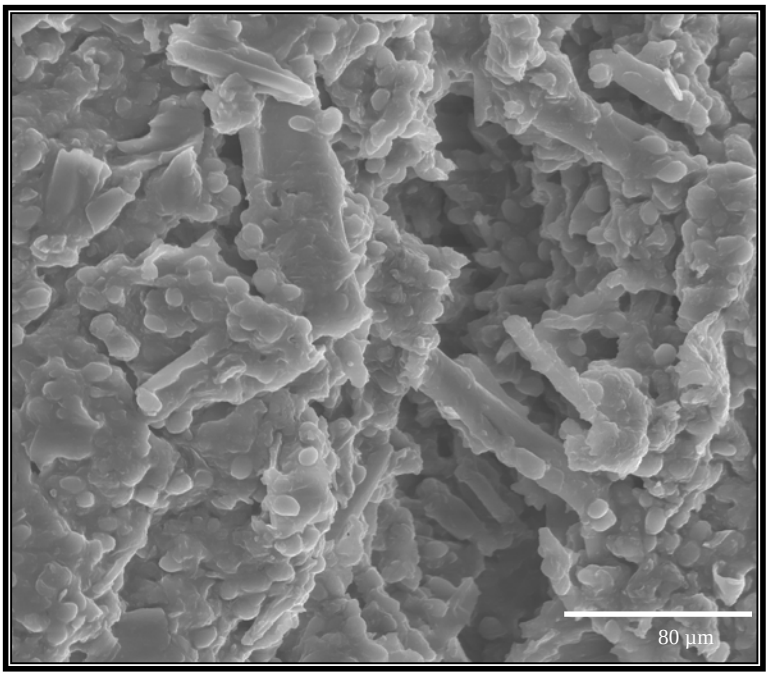


Figura 5.21. Microscopia eletrônica de varredura dos resíduos do processo SSF (fundos de fermentação e leveduras)

5.4. ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O estudo da hidrólise enzimática da celulose contida na *celulignina* pré-tratada (*celuligninaG*) foi realizado por meio de um planejamento experimental de 3 níveis, 4 fatores e 6 réplicas do ponto central (Tabela 5.1) como descrito em materiais e métodos. O planejamento fatorial foi

conduzido para avaliar os efeitos da temperatura, da carga enzimática, do teor de sólido e do pH; sobre a concentração de glicose liberada (Calado & Montgomery, 2003).

Tabela 5.1. Planejamento Fatorial Completo 3^4 (4 Fatores, 3 Níveis)

Fatores	Nível Inferior (-1)	Nível Intermediário (0)	Nível Superior (+1)
Temperatura (°C)	30,0	40,0	50,0
[Enzima] (FPU/g)	5,0	17,5	30,0
pH	5,0	5,5	6,0
% Sólido (m/v)	2,0	6,0	10,0

O planejamento fatorial completo de três níveis foi escolhido por permitir a determinação dos efeitos lineares e quadráticos das variáveis, assim como a obtenção dos pontos máximos ou mínimos dentro da faixa avaliada. A matriz gerada pelo planejamento, proposta para o estudo da hidrólise enzimática, é apresentada na Tabela 5.2. As variáveis de resposta consideradas foram: conversão a glicose (g glicose/g *celulignina*), que foi calculada com base na quantidade de *celulignina*, e concentração de glicose (g/L).

É importante ressaltar que a quantificação de glicose foi realizada em um tempo fixo de 48 horas depois de se ter incubado o sistema reacional com o consórcio GC220. A Tabela 5.2 apresenta os resultados obtidos nas hidrólises enzimáticas realizadas.

Tabela 5.2. Concentração final de glicose e conversão a glicose em cada uma das combinações do planejamento experimental utilizando o consórcio enzimático GC220

Experim.	Temperatura (ºC)	pH	Carga Enzimática (FPU/g)	% Sólido (g/100mL)	Glicose (g/L)	Conversão (g glicose /g *celuligninaG)*
1	30,0	5,0	5,0	2,0	0,361	0,018
2	30,0	5,0	5,0	6,0	1,883	0,030
3	30,0	5,0	5,0	10,0	2,356	0,021
4	30,0	5,0	17,5	2,0	5,456	0,267
5	30,0	5,0	17,5	6,0	12,417	0,199
6	30,0	5,0	17,5	10,0	16,256	0,146
7	30,0	5,0	30,0	2,0	2,894	0,142
8	30,0	5,0	30,0	6,0	17,433	0,279
9	30,0	5,0	30,0	10,0	17,433	0,157
10	30,0	5,5	5,0	2,0	3,317	0,163
11	30,0	5,5	5,0	6,0	5,656	0,090
12	30,0	5,5	5,0	10,0	5,078	0,046
13	30,0	5,5	17,5	2,0	7,739	0,379
14	30,0	5,5	17,5	6,0	11,500	0,184
15	30,0	5,5	17,5	10,0	9,722	0,088
16	30,0	5,5	30,0	2,0	7,685	0,377
17	30,0	5,5	30,0	6,0	11,872	0,190
18	30,0	5,5	30,0	10,0	0,628	0,006
19	30,0	6,0	5,0	2,0	0,822	0,040
20	30,0	6,0	5,0	6,0	1,800	0,029
21	30,0	6,0	5,0	10,0	2,661	0,024
22	30,0	6,0	17,5	2,0	3,311	0,162
23	30,0	6,0	17,5	6,0	12,781	0,204
24	30,0	6,0	17,5	10,0	14,574	0,131
25	30,0	6,0	30,0	2,0	6,042	0,296
26	30,0	6,0	30,0	6,0	16,979	0,272
27	30,0	6,0	30,0	10,0	28,367	0,255
28	40,0	5,0	5,0	2,0	3,704	0,182
29	40,0	5,0	5,0	6,0	16,020	0,256
30	40,0	5,0	5,0	10,0	20,126	0,181
31	40,0	5,0	17,5	2,0	12,049	**0,590**
32	40,0	5,0	17,5	6,0	34,274	**0,548**
33	40,0	5,0	17,5	10,0	**43,736**	0,394
34	40,0	5,0	30,0	2,0	**13,913**	**0,682**
35	40,0	5,0	30,0	6,0	26,576	0,425
36	40,0	5,0	30,0	10,0	**45,119**	0,406
37	40,0	5,5	5,0	2,0	6,328	0,310
38	40,0	5,5	5,0	6,0	16,372	0,262
39	40,0	5,5	5,0	10,0	29,461	0,265
40	40,0	5,5	17,5	2,0	13,421	**0,658**
41	40,0	5,5	17,5	6,0	30,763	0,492
42	40,0	5,5	17,5	10,0	37,956	0,342

Experim.	Temperatura (°C)	pH	Carga Enzimática (FPU/g)	% Sólido (g/100mL)	Glicose (g/L)	Conversão (g glicose /g *celuligninaG)*
43	40,0	5,5	30,0	2,0	11,672	**0,572**
44	40,0	5,5	30,0	6,0	27,328	0,437
45	40,0	5,5	30,0	10,0	**44,316**	0,399
46	40,0	6,0	5,0	2,0	3,899	0,191
47	40,0	6,0	5,0	6,0	9,522	0,152
48	40,0	6,0	5,0	10,0	24,299	0,219
49	40,0	6,0	17,5	2,0	6,802	0,333
50	40,0	6,0	17,5	6,0	20,544	0,329
51	40,0	6,0	17,5	10,0	**45,097**	0,406
52	40,0	6,0	30,0	2,0	7,713	0,378
53	40,0	6,0	30,0	6,0	29,045	0,465
54	40,0	6,0	30,0	10,0	40,321	0,363
55	50,0	5,0	5,0	2,0	2,910	0,143
56	50,0	5,0	5,0	6,0	7,159	0,115
57	50,0	5,0	5,0	10,0	11,233	0,101
58	50,0	5,0	17,5	2,0	8,445	0,414
59	50,0	5,0	17,5	6,0	30,546	0,489
60	50,0	5,0	17,5	10,0	**50,526**	0,455
61	50,0	5,0	30,0	2,0	10,651	**0,522**
62	50,0	5,0	30,0	6,0	36,149	**0,578**
63	50,0	5,0	30,0	10,0	**57,496**	**0,517**
64	50,0	5,5	5,0	2,0	3,789	0,186
65	50,0	5,5	5,0	6,0	14,792	0,237
66	50,0	5,5	5,0	10,0	27,217	0,245
67	50,0	5,5	17,5	2,0	10,029	0,491
68	50,0	5,5	17,5	6,0	27,663	0,443
69	50,0	5,5	17,5	10,0	**47,887**	0,431
70	50,0	5,5	30,0	2,0	12,153	**0,596**
71	50,0	5,5	30,0	6,0	32,030	0,512
72	50,0	5,5	30,0	10,0	**52,493**	0,472
73	50,0	6,0	5,0	2,0	3,483	0,171
74	50,0	6,0	5,0	6,0	13,408	0,215
75	50,0	6,0	5,0	10,0	23,639	0,213
76	50,0	6,0	17,5	2,0	7,525	0,369
77	50,0	6,0	17,5	6,0	25,949	0,415
78	50,0	6,0	17,5	10,0	40,024	0,360
79	50,0	6,0	30,0	2,0	8,264	0,405
80	50,0	6,0	30,0	6,0	27,708	0,443
81	50,0	6,0	30,0	10,0	**44,781**	0,403
82(C)	40,0	5,5	17,5	6,0	27,426	0,439
83(C)	40,0	5,5	17,5	6,0	31,247	**0,500**
84(C)	40,0	5,5	17,5	6,0	30,833	0,493
85(C)	40,0	5,5	17,5	6,0	34,320	**0,549**
86(C)	40,0	5,5	17,5	6,0	29,670	0,475
87(C)	40,0	5,5	17,5	6,0	30,735	0,492

Nos resultados da Tabela 5.2 pode ser observado como as maiores concentrações de glicose (acima de 43 g/L) foram obtidas para diversos níveis de temperatura e pH, sendo necessários um teor de sólidos de 10% e cargas enzimáticas no nível superior ou no ponto central (experimentos 33, 36, 45, 51, 60, 63, 69, 72 e 81).

No que diz respeito à conversão a glicose, os resultados mais significativos (acima de 0,54 g glicose/g *celuligninaG*) corresponderam a ensaios com um teor de sólido baixo (6 ou 2 %), uma alta carga enzimática (17,5 ou 30 FPU/g), sem apresentar uma tendência para os fatores pH e temperatura.

Ao se realizar a análise estatística dos resultados do planejamento experimental foi possível, para cada variável de resposta, construir o gráfico de Pareto (Figuras 5.22 e 5.23), o qual apresenta tanto gráfica como numericamente os efeitos de cada fator, assim como o das suas interações. A análise estatística também permitiu realizar, para cada variável resposta, a análise de variância (ANOVA), a qual é apresentada em forma de tabela, a seguir.

Os fatores que possuem significância estatística (*p-level* < 0,05), assim como a magnitude do efeito estimado de cada variável são apresentados no gráfico de Pareto (Figura 5.22). Nesse diagrama, o efeito é representado por barras, sendo que apenas aquelas barras que ultrapassam a linha vertical do 0,05 *p-level* apresentam significância estatistica. O valor do *p-level* garante, com um nível de confiança de 95%, que um determinado fator influencia a variável de resposta analisada; este valor é usualmente assumido em pesquisas biotecnológicas analisadas estatisticamente (Montgomery, 2001; Calado & Montgomery, 2003).

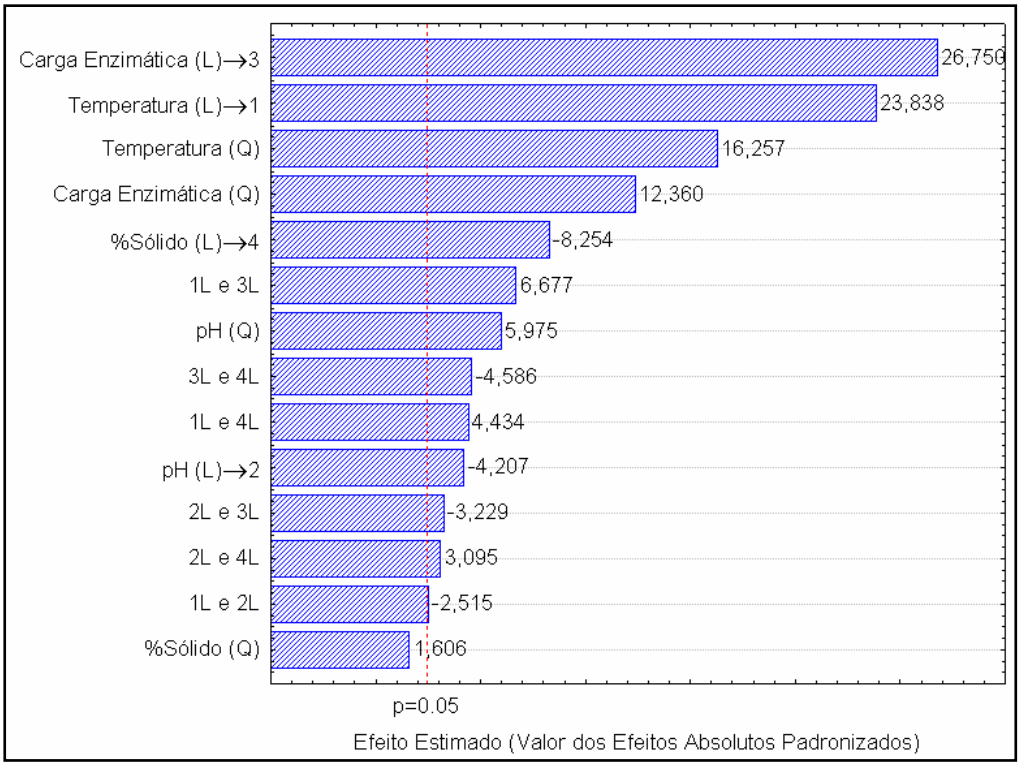


Figura 5.22. Gráfico de Pareto para a conversão da *celuligninaG* em glicose (g glicose/g *celuligninaG*)

É possível observar, claramente, que os maiores efeitos positivos (26,750) são gerados pela carga enzimática, seguida da temperatura (23,838) e seus efeitos quadráticos, todos com significância estatística sobre a variável resposta. O teor de sólido no meio apresentou um efeito negativo (-8,254), estatisticamente significativo, sobre a conversão do material sólido em glicose, o que pode ser explicado pela inibição que a glicose e a celobiose exercem sobre as enzimas celulolíticas quando as concentrações desses substratos no meio começam a aumentar (Lynd *et al.*, 2002). O pH aparece com um efeito quase marginal, embora numericamente possua significância estatística. Em geral, a maior parte das interações entre os fatores do planejamento experimental não

apresentaram efeitos que tenham uma influência marcada sobre a conversão em glicose.

Na análise de variância (ANOVA) para a conversão da *celulignina* em glicose, como variável de resposta, é possível observar que tanto a ordem de magnitude para soma de quadrados dos efeitos lineares de temperatura e carga enzimática, bem como a ordem de magnitude para seus efeitos quadráticos foram notavelmente superiores aos valores correspondentes para outros efeitos, mesmo que esses outros efeitos apresentaram significância estatística. Neste caso, só a interação temperatura *vs* pH apresentou uma significância estatística marginal (*p-level* próximo de 0,05) sendo o efeito quadrático do teor de sólido o único a não apresentar significância estatística.

Tabela 5.3. Análise de variância (ANOVA) para a conversão da *celulignina* em glicose (g glicose/g *celuligninaG*) R^2 = 0,88

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_o	Valor do *p-level*
Temperatura (L) 1	0,611	1	0,611	568,278	0,000000
Temperatura (Q)	0,284	1	0,284	264,301	0,000003
pH (L) 2	0,019	1	0,019	17,700	0,005641
pH (Q)	0,038	1	0,038	35,702	0,000986
Carga enzimática (L) 3	0,770	1	0,770	715,570	0,000000
Carga enzimática (Q)	0,164	1	0,164	152,783	0,000017
%Sólido (L) 4	0,073	1	0,073	68,135	0,000171
%Sólido (Q)	0,003	1	0,003	2,580	0,159355
1L e 2L	0,007	1	0,007	6,328	0,045565
1L e 3L	0,048	1	0,048	44,590	0,000546
1L e 4L	0,021	1	0,021	19,665	0,004402
2L e 3L	0,011	1	0,011	10,428	0,017927
2L e 4L	0,010	1	0,010	9,579	0,021250
3L e 4L	0,023	1	0,023	21,031	0,003747
Falta e Ajuste	0,288	66	0,004	4,657	0,059923
Erro Puro	0,006	6	0,001		
Total	2,511	86			

Adicionalmente, na análise de variância (Tabela 5.3), nota-se que o modelo estatístico apresentou um ajuste adequado aos resultados experimentais, tendo uma variância explicada pelo modelo de 88% e uma falta de ajuste sem significância estatística (*p-level* > 0,05). A ordem e os valores dos efeitos apresentados na análise estatística realizada pelo método de Fisher (ANOVA) são semelhantes aos apresentados na análise realizada empregando a estatística *t de Student*, conforme ilustrado no gráfico de Pareto (Figura 5.22).

Quando a concentração de glicose no meio foi analisada como variável de resposta pelo teste *t de Student* (Figura 5.23), a influência de cada fator e das suas interações sobre esta variável de resposta mudaram frente aos resultados encontrados para a conversão a glicose. Neste caso, o fator que apresentou o maior efeito sobre a concentração de glicose foi o teor de sólido, com uma magnitude superior ao restante dos fatores avaliados. Da mesma forma ao observado anteriormente para a conversão a glicose, os fatores de temperatura e concentração de enzima apresentaram efeitos positivos de grande importância. A interação existente entre a porcentagem de sólido e a temperatura, os fatores de maior importância, exerceram uma influência positiva sobre a concentração de glicose.

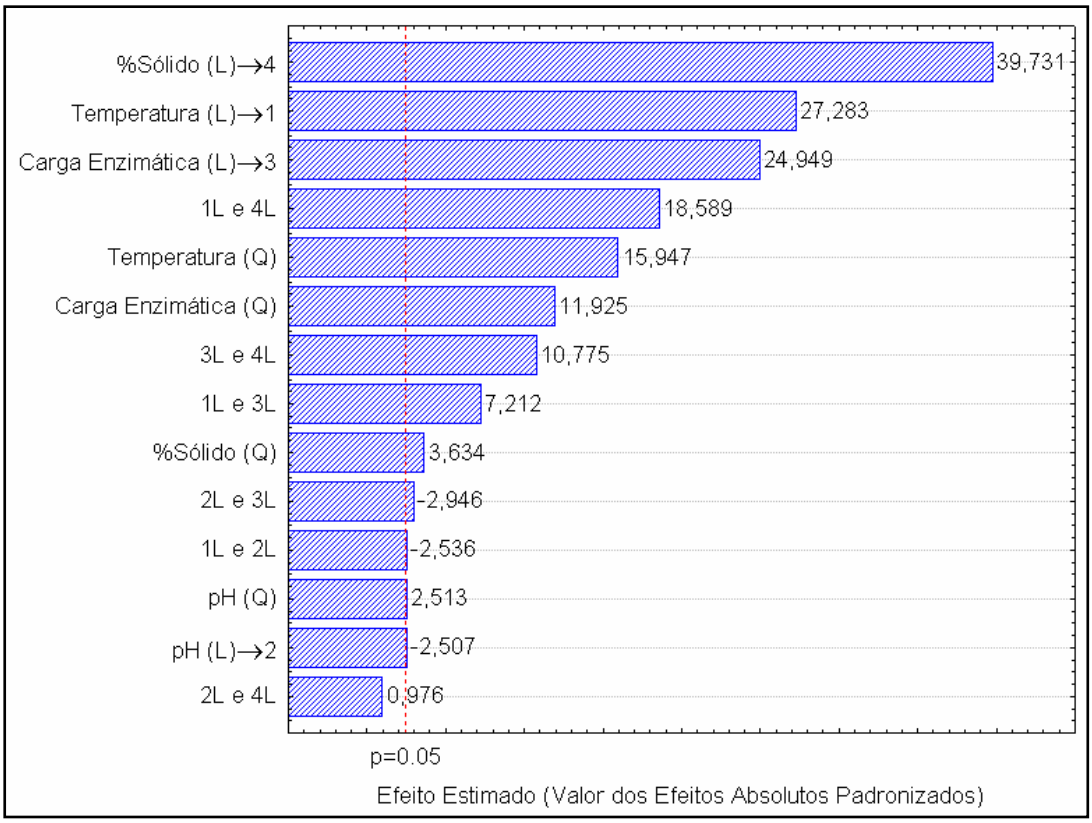


Figura 5.23. Gráfico de Pareto de efeitos padrão, para a concentração de glicose (g glicose/L)

Na Tabela 5.4 pode ser observado como a soma de quadrados, assim como a média quadrática correspondente, para os efeitos lineares de temperatura, carga enzimática e teor de sólido possuem uma ordem de magnitude muito superior à correspondente para o pH, já indicando como este último fator influi pouco na variável de resposta conversão a glicose.

Na analise estatística realizada pelo método de Fisher apresentaram alta significância estatística os efeitos lineares para temperatura, carga enzimática e teor de sólido; os efeitos quadráticos de temperatura e carga enzimática, assim como as interações temperatura *vs* carga enzimática, temperatura *vs* teor de sólidos, carga enzimática *vs* teor de

sólidos. O restante dos efeitos, apesar de apresentarem significância estatística, não exerceram influência marcante sobre a resposta.

Tabela 5.4. Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose (g glicose/L). R^2 = 0,914

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Media Quadrática	F_o	Valor do *p-level*
Temperatura (L) 1	3127,061	1	3127,061	744,361	0,000000
Temperatura (Q)	1068,390	1	1068,390	254,318	0,000004
pH (L) 2	26,407	1	26,407	6,286	0,046079
pH (Q)	26,536	1	26,536	6,317	0,045701
Carga enzimática (L) 3	2614,845	1	2614,845	622,434	0,000000
Carga enzimática (Q)	597,422	1	597,422	142,209	0,000021
%Sólido (L) 4	6631,730	1	6631,730	1578,608	0,000000
%Sólido (Q)	55,482	1	55,482	13,207	0,010911
1L e 2L	27,013	1	27,013	6,430	0,044332
1L e 3L	218,522	1	218,522	52,017	0,000360
1L e 4L	1451,627	1	1451,627	345,543	0,000002
2L e 3L	36,451	1	36,451	8,677	0,025759
2L e 4L	4,004	1	4,004	0,953	0,366612
3L e 4L	487,764	1	487,764	116,107	0,000038
Falta de Ajuste	1560,788	66	23,648	5,629	0,017989
Erro Puro	25,206	6	4,201		
Total	18414,900	86			

Em resumo, a análise de variância (Tabela 5.4) mostra um excelente ajuste do modelo aos resultados experimentais, já que o modelo explica 91,4% (R^2) da variação dos dados. Já a significância da falta de ajuste pode ser explicada com base na baixa ordem de magnitude do erro experimental ao se comparar como a magnitude dos resultados. A influência dos fatores apresentados na análise estatística realizada pelo método de Fisher (ANOVA), discutida anteriormente, concorda com os resultados apresentados na análise realizada pelo método baseado na estatística *t de Student*, ilustrada no gráfico de Pareto (Figura 5.23).

Para ambas as variáveis de resposta, conversão a glicose e concentração de glicose, o pH exerceu um efeito linear com uma

magnitude menor aos apresentados pelo restante dos fatores avaliados. Porém, valores de pH fora da faixa avaliada experimentalmente, sejam estes maiores ou menores, influência da fonte de variação pH quadrático, pode gerar mudanças no comportamento da enzima, levando a um colapso do processo.

Com base na análise realizada para a otimização da hidrólise enzimática, o pH foi eliminado do modelo matemático, devido à pouca importância apresentada na análise estatística, o que levou a selecionar o valor de 5 para a realização de experimentos posteriores. Este valor de pH é justificado pelas seguintes razões: na literatura, a maioria dos trabalhos realizados com preparados enzimáticos celulósicos utiliza este valor de pH nas hidrólises enzimáticas; 5 é um valor de pH no qual a contaminação por bactérias da fermentação etanólica é incomum (Öhgren et al., 2007); o desempenho da levedura *S. cerevisiae* não é afetado neste valor, cujo pH ótimo para a fermentação situa-se na faixa de 4-4,5; e, finalmente, este valor de pH encontra-se dentro da faixa de estabilidade das enzimas utilizadas.

Cabe ressaltar que para as duas variáveis de resposta (concentração de glicose e conversão a glicose), o modelo quadrático proposto pelo planejamento ajusta-se apropriadamente aos dados experimentais como é confirmado pela magnitude do coeficiente de correlação (0,91 para a concentração de glicose e 0,88 para a conversão a glicose). Conclui-se, assim, que o modelo representa, com uma boa aproximação, a tendência dos dados experimentais. Os modelos gerados na análise estatística estão representados por uma função quadrática do tipo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot (Temp.) + \beta_2 \cdot (CargaEnzim.) + \beta_3 \cdot (\%Solid) + \beta_4 \cdot (Temp.)^2 + \beta_5 \cdot (CargaEnzim.)^2 + \beta_6 \cdot (\%Solid)^2 + \beta_7 \cdot (Temp. \times CargaEnzim.) + \beta_8 \cdot (Temp. \times \%Solid) + \beta_9 \cdot (\%Solid \times CargaEnzim.)$$

Equação 5.1.

Onde as variáveis acima são empregadas em valores escalonados (entre -1 e 1). Os parâmetros determinados para as equações quadráticas que representam cada variável de resposta encontram-se na Tabela 5.5.

Tabela 5.5. Coeficientes dos modelos da equação quadrática de otimização

Coeficientes	Variáveis de Resposta	
	Conversão a Glicose (g glicose/g *celuligna* G)	Concentração de Glicose (g/L)
β_0	0,30	18,47
β_1	0,11	7,61
β_2	0,12	6,95
β_3	-0,04	11,08
β_4	0,06	3,64
β_5	0,05	3,75
β_6	0,01	0,84
β_7	0,04	2,46
β_8	0,02	6,35
β_9	-0,02	3,68

Foram realizadas 3 otimizações. Na primeira, buscou-se por condições que permitissem obter a máxima conversão de *celuligninaG* em glicose. Na segunda, objetivou-se alcançar a maior concentração de glicose na hidrólise enzimática. Na terceira otimização, visou-se à maximização das duas variáveis de resposta simultaneamente, por meio da função de Derringer & Suich ou função *Desirability global*, neste caso, dada por $D_2 = d_1 d_2$; onde cada d_i é a variável de resposta normalizada entre 0 e 1 (Derringer & Suich, 1980; Montgomery & Calado, 2003; Montgomery, 2001).

Os valores no ótimo de cada fator; os valores máximos teóricos (preditos pelo modelo) de cada variável de resposta, concentração de glicose e conversão a glicose, e os da função *Desirability* global são apresentados na Tabela 5.6. Cabe notar que as condições que levaram aos valores máximos da conversão de *celluligninaG* a glicose e da concentração de glicose são similares para temperatura e concentração de enzima. Porém, para o teor de sólido, as concentrações são opostas, resultando no nível superior para o máximo de concentração de glicose e no nível inferior para a conversão a glicose, confirmando que a porcentagem de sólido é o fator que permitirá conciliar as duas variáveis de resposta.

A Figura 5.24 apresenta as superfícies de resposta geradas na otimização da conversão de *celluligninG* em glicose e a concentração de glicose simultaneamente (função *Desirability global*). Nestas figuras é possível observar como a obtenção de um resultado ótimo está restrita a condições de temperatura na faixa de 40 a 50°C, concentração de enzima entre 18 e 30 FPU/g *celluligniumanG* e o teor de sólido entre 8 e 10%, como pode ser visto nas superfícies de resposta, sendo este último fator o que apresenta menor flexibilidade na faixa de valores que geram a zona de altos valores da função *Desirability global*.

Tabela 5.6. Valores ótimos preditos pelos modelos estatísticos e valores obtidos na validação experimental

Resposta	Temp. (°C)	% Sólido (%)	Carga Enzimática (FPU/g)	Valores Preditos		Validação	
				Conversão a Glicose (g glicose/ g *celuligninaG*)	**Concentração de Glicose** (g glicose/L)	**Conversão a Glicose** (g glicose/ g *celuligninaG*)	**Concentração de Glicose** (g glicose/L)
Para Conversão à Glicose	43	2	24,4	0,58 ± 0,06	-	0,67 ± 0,09	13,05 ± 3,2
Para Concentração de Glicose	47	10	25,6	-	50,98 ± 2,9	0,52 ± 0,09	58.40 ± 3,2
Para Função *Desirability*	47	10	25,9	0,47 ± 0,06	50,98 ± 2,9	0,54 ± 0,09	60,08 ± 3,2

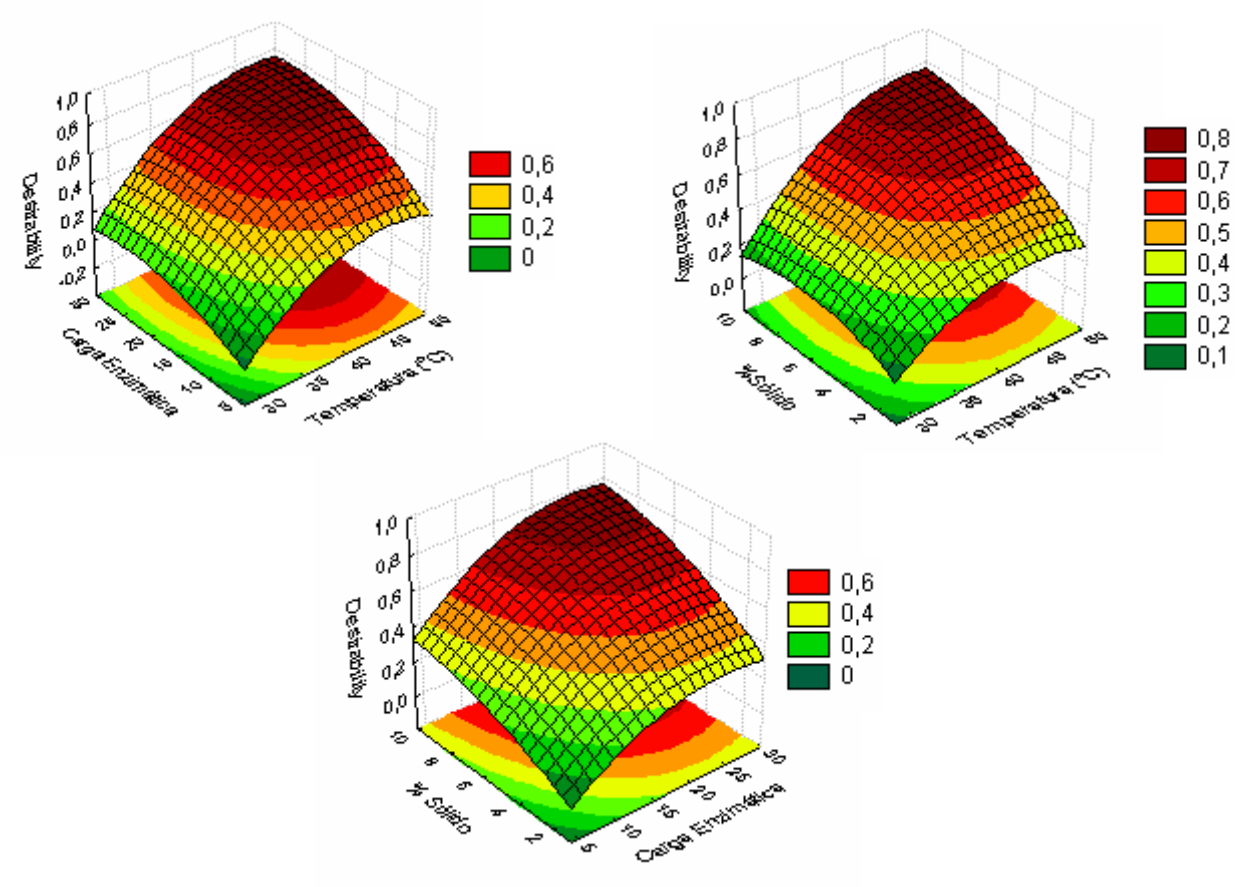


Figura 5.24. Superfície de resposta correspondente à função *Desirability global*

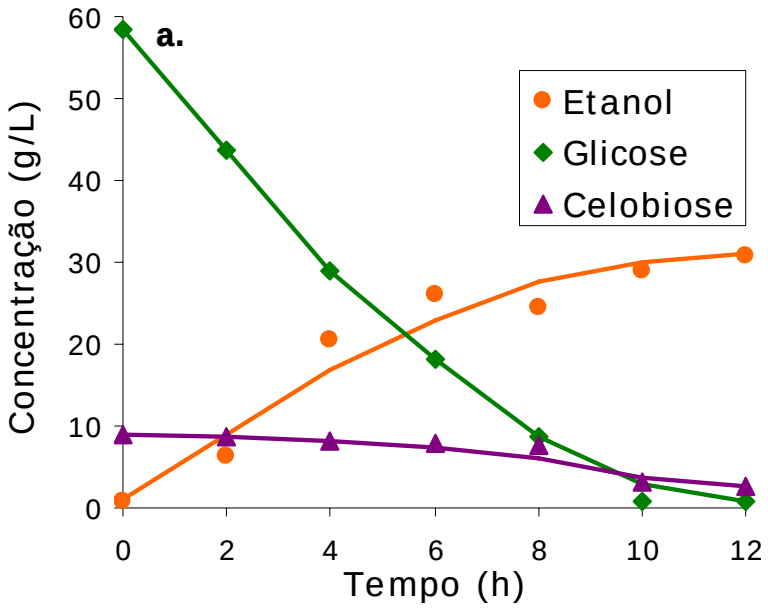
Com o objetivo de se avaliar a fermentabilidade dos hidrolisados obtidos da *celuligninaG* proveniente do bagaço de cana-de-açúcar e validar os pontos ótimos preditos na análise estatística, foram realizadas as hidrólises enzimáticas propostas pela abordagem de otimização, seguidas de fermentação.

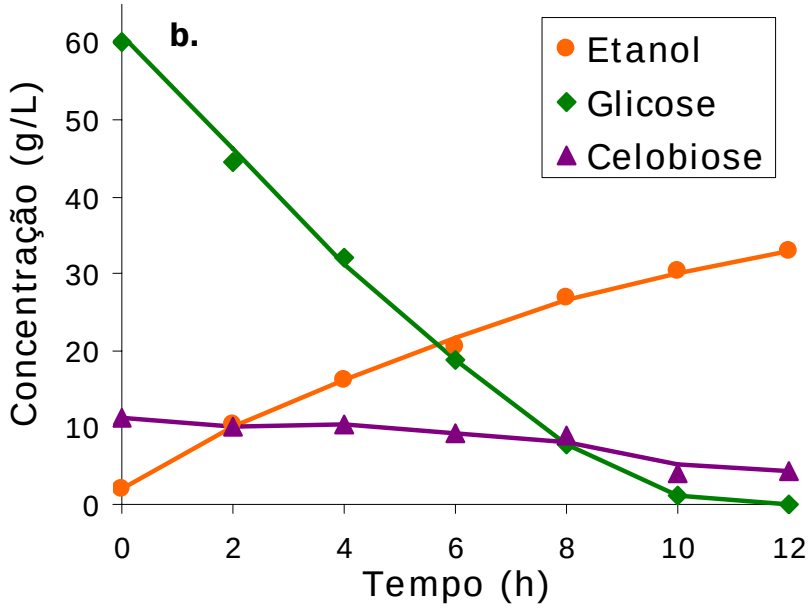
Os resultados da validação da hidrólise enzimática foram superiores aos preditos pelo modelo e são apresentados na Tabela 5.6. O fato que os valores obtidos na validação tenham sido superiores aos valores

preditos pelos experimentos propostos pelo modelo estatístico pode ser devido às validações terem sido realizadas em biorreator, o que permitiu melhor controle das variáveis do processo. Conversões de *celuligninaG* a glicose de 54% e concentrações de glicose da ordem de 60 g/L foram alcançadas nestas validações. De acordo com os resultados obtidos, para conseguir a conversão da maior parte da celulose existente na *celuligninaG*, não se podem esperar altas concentrações de glicose no meio (Figura 5.25c.).

As fermentações foram realizadas utilizando como meio de cultivo os hidrolisados obtidos sob as condições preditas pelo modelo estatístico, contendo ainda o sólido residual da hidrólise. A Figura 5.25 apresenta as cinéticas de fermentação para cada avaliação.

O comportamento das fermentações é similar àquele obtido em fermentações realizadas em meio sintético com glicose, o que evidencia a alta fermentabilidade do hidrolisado utilizado como meio. A concentração de etanol alcançada, em cada fermentação, supera a quantidade estequiométrica que seria obtida na conversão de uma quantidade de glicose igual à reportada como inicial em cada fermentação, o que pode ser explicado por uma reativação da hidrólise enzimática depois que a levedura consome parte da glicose que estava inibindo as enzimas celulolíticas. Uma diminuição da concentração de celobiose foi detectada depois de 10 horas de fermentação, o que confirma a retomada da atividade enzimática.


a.
Etanol
Glicose
Celobiose
Concentração (g/L)
Tempo (h)
0
10
20
30
40
50
60
0
2
4
6
8
10
12


b.
Etanol
Glicose
Celobiose
Concentração (g/L)
Tempo (h)
0
10
20
30
40
50
60
0
2
4
6
8
10
12

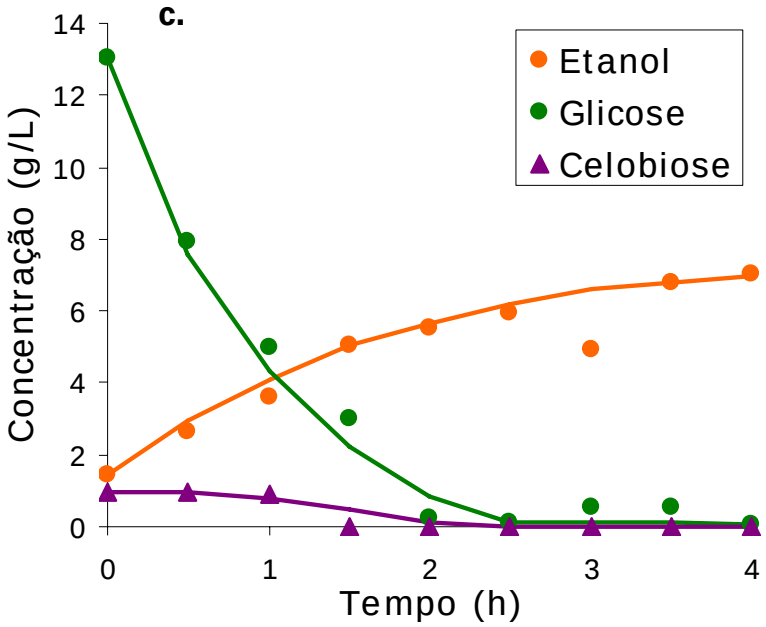


Figura 5.25. Cinéticas de fermentação do hidrolisado obtido nas condições preditas para **(a)** alta concentração de glicose; **(b)** para função *Desirability* e **(c)** para alta conversão a glicose

5.5. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO PROCESSO SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*)

Um planejamento fatorial completo (3 fatores, 2 níveis) foi realizado para investigar o comportamento do processo SSF ao serem manipulados 3 fatores considerados importantes na fermentação do tipo SSF: teor de sólido (% Sólido), concentração de inóculo (g/L) e tempo de pré-hidrólise enzimática (t_{HE}). A concentração de etanol, depois de 24 horas

de fermentação, foi a variável de resposta analisada neste planejamento. Estes fatores, seus respectivos níveis e a variável de resposta estão especificados na Tabela 5.7. As faixas escolhidas para cada um dos fatores tentaram abranger os valores utilizados nos trabalhos nesta área nos anos mais recentes (Stenberg *et al.*, 1999; Wingren *et al.*, 2005; Sassner *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2006; Sassner *et al.*, 2006ª; Öhgren *et al.*, 2006; Öhgren *et al.*, 2007).

Tabela 5.7. Planejamento fatorial completo (2^3)

Experimento	% Sólido (m/v)	Conc. Inóculo (g/L)	t_{HE} (hora)	Etanol (g/L)
1	6	2	12	15,21
2	10	2	12	18,85
3	6	6	12	12,49
4	10	6	12	17,44
5	6	2	24	12,77
6	10	2	24	18,52
7	6	6	24	14,83
8	10	6	24	23,61
9 (C)	8	4	18	19,67
10 (C)	8	4	18	20,17
11 (C)	8	4	18	18,77

Como será discutido a continuação, os resultados da concentração de etanol não evidenciaram diferenças marcantes, não permitindo que se conseguisse, pela análise estatística, elucidar a real influência dos fatores avaliados.

O gráfico de Pareto (Figura 5.26), gerado na análise dos resultados, apresenta os efeitos dos fatores avaliados, assim como de suas interações. A porcentagem de sólido na fermentação foi o fator mais importante a ser levado em conta quando a concentração final de etanol

foi analisada. A concentração celular e o tempo inicial de hidrólise enzimática não apresentaram significância individualmente, porém a interação entre eles ocupou o terceiro lugar em grau de importância no gráfico de Pareto.

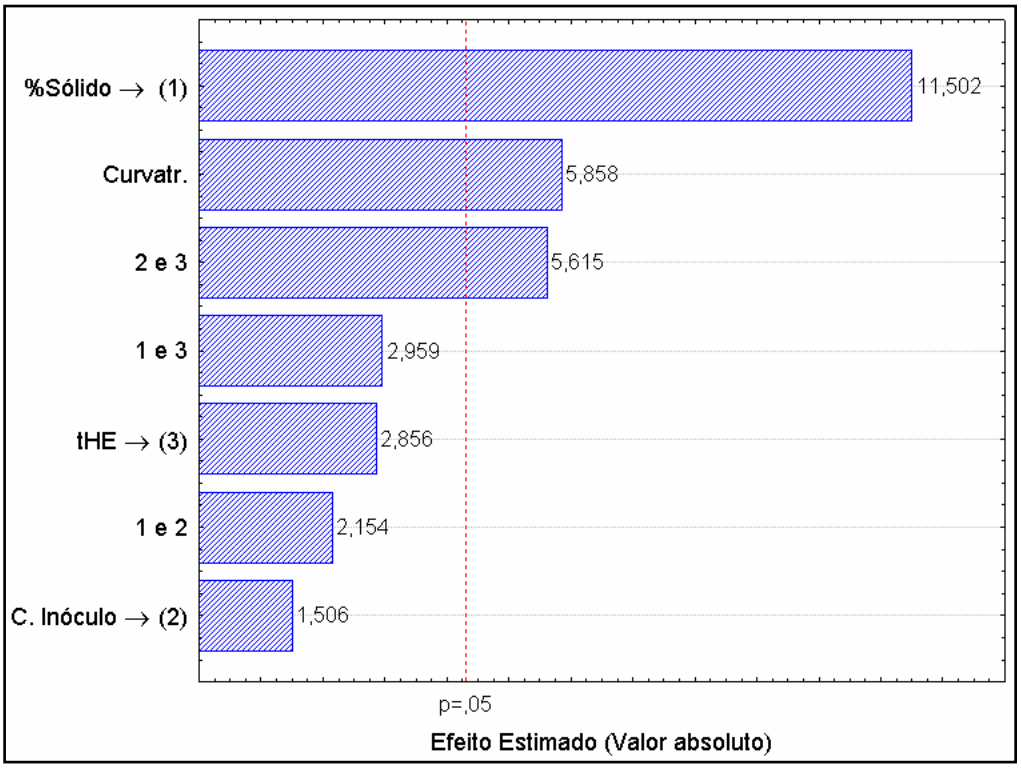


Figura 5.26. Gráfico de Pareto para concentração de etanol como variável de resposta (g/L)

O fato desses fatores não apresentarem importância, pode ser explicado pelo tipo de variável de resposta eleita. No processo SSF existe um momento no qual o fator limitante deixa de ser a levedura, no consumo inicial 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, independentemente da concentração de levedura ou do tempo inicial de hidrólise enzimática.

Devido à importância da curvatura, como apresentado no gráfico de Pareto (Figura 5.26) e na tabela de ANOVA (Tabela 5.8), pode-se esperar que o modelo que inclui os efeitos quadráticos represente mais adequadamente os resultados experimentais, embora o ajuste apresentado pelo modelo de primeira ordem com termos de interação tenha sido bom, com R^2 = 0,988.

Tabela 5.8. Análise de variância (Tabela de ANOVA) para concentração de etanol como variável de resposta (g/L)

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Media Quadrática	F_o	Valor do *p-level*
Curvatura	17,343	1	17,343	34,321	0,028
% Sólido (1)	66,851	1	66,851	132,295	0,007
C. Inóculo (2)	1,1469	1	1,147	2,270	0,271
t_{HE} (3)	4,122	1	4,122	8,157	0,104
1 e 2	2,344	1	2,344	4,639	0,164
1 e 3	4,425	1	4,425	8,757	0,098
2 e 3	15,931	1	15,931	31,528	0,030
Falta de ajuste	0,368	1	0,3685	0,729	0,483
Erro Puro	1,011	2	0,505		

Na análise de variância, apesar do tempo de pré-hidrólise enzimática e da concentração de inóculo não possuírem significância como fatores independentes, a interação entre eles mostrou-se significativa. Nas superfícies de resposta da Figura 5.27 (a e b) é possível notar que a variável mais importante é a porcentagem de sólidos. Valores acima de 8% fazem com que o tempo de hidrólise não apresente relevância frente aos resultados de concentração final de etanol.

A Figura 5.27(c) apresenta a interação entre concentração de inóculo e o tempo de hidrólise enzimática mostrando que, só com o aumento de ambos os fatores, a concentração de etanol pode ser aumentada. Os resultados do planejamento anterior proporcionaram informação suficiente para decidir aumentar a porcentagem de sólido e aprofundar investigação sobre os fatores: concentração de inóculo e o tempo de hidrólise enzimática.

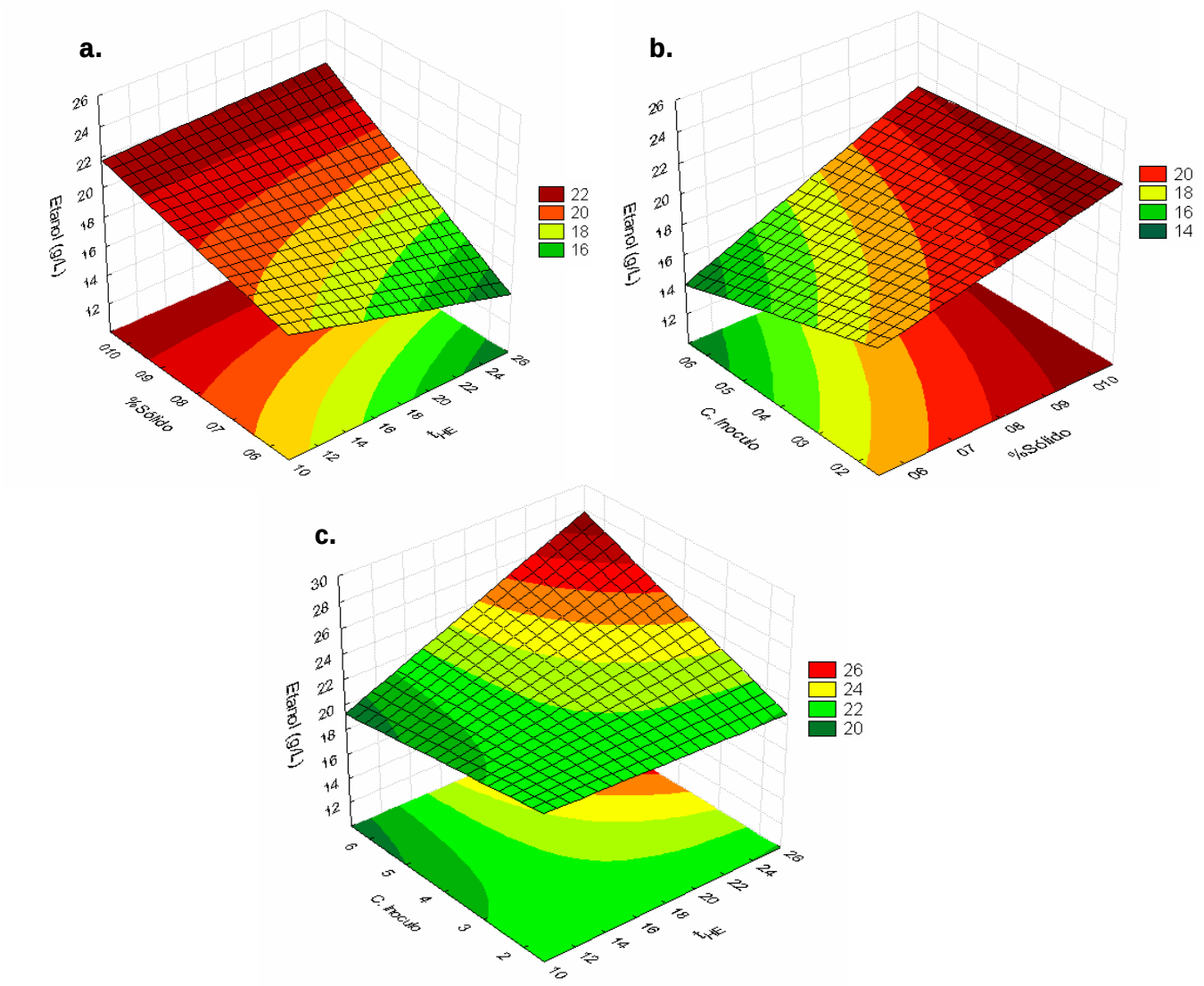


Figura 5.27. Superfícies de Resposta, **(a)** % Sólido vs Tempo de Hidrólise Enzimática; **(b)** Concentração de Inóculo vs %Sólido; **(c)** Tempo de Hidrólise Enzimática vs Concentração de Inóculo

Desta forma, foi construído um novo planejamento fatorial completo com os mesmos fatores em diferentes níveis. O planejamento experimental apresentou 2 níveis (2^3), com repetições no ponto central (Tabela 5.9).

Tabela 5.9. Planejamento Fatorial Completo (3 Fatores, 2 Níveis)

Experimento	% Sólido (m/v)	Conc.Inóculo (g/L)	t_{HE} (hora)	Etanol (g/L)
1	10	2	12	19,72 ± 3,25
2	20	2	12	45,71 ± 3,25
3	10	6	12	21,49 ± 3,25
4	20	6	12	45,24 ± 3,25
5	10	2	18	26,52 ± 3,25
6	20	2	18	46,97 ± 3,25
7	10	6	18	24,37 ± 3,25
8	20	6	18	43,18 ± 3,25
9 (C)	15	4	15	32,35 ± 3,25
10 (C)	15	4	15	31,97 ± 3,25
11 (C)	15	4	15	29,04 ± 3,25

Os resultados obtidos neste novo planejamento experimental foram submetidos à análise estatística, inicialmente através do gráfico de Pareto, o qual apresenta tanto gráfica quanto numericamente os efeitos de cada fator, assim como os das suas interações. A análise estatística também inclui a análise de variância (ANOVA), exibida em forma de tabela (Barros Neto *et al.*, 1995; Barros Neto *et al.*, 2001; Rodrigues & Iemma, 2005).

O aumento no teor de sólidos fez com que as concentrações de etanol alcançadas fôssem maiores, como é apresentado na Tabela 5.9. Além da quantificação final de etanol, como variável única de resposta, foi realizada uma cinética do processo SSF em fermentômetros e cálculo do etanol equivalente. O fermentômetro é um dispositivo que permite a saída de CO_2, mas impede a entrada de ar no sistema, possibilitando o acompanhamento da perda de peso no sistema. Posteriormente, por meio de conversão estequiométrica, é calculada a concentração do etanol equivalente.

Um acompanhamento da perda de peso devido ao desprendimento de CO_2 foi realizado para cada experimento do planejamento (Figuras 5.28 e 5.29). Para facilitar as análises, as 8 cinéticas são apresentadas em 2 figuras diferentes, tal que cada uma agrupa as cinéticas de experimentos conduzidos com fatores iguais.

Na Figura 5.28, na qual os perfis são agrupados pelo teor de sólido utilizado (%S), observa-se que as concentrações de etanol aumentam consideravelmente ao se aumentar este fator, uma vez que, para um teor de 20% (m/v) de sólidos foram obtidos entre 50 e 60 g/L de $Etanol_{Equivalente}$ e para um teor de 10% (m/v) de sólidos, entre 25 e 30 g/L de $Etanol_{Equivalente}$. Ao analisar os experimentos realizados, observamos que para o mesmo teor de sólido não existe uma diferença relevante na concentração final de etanol alcançada depois de 32 horas do processo. Porém, as cinéticas exibem grande diferença quando, para o mesmo teor de sólidos, são avaliadas diferentes cargas de inóculo.

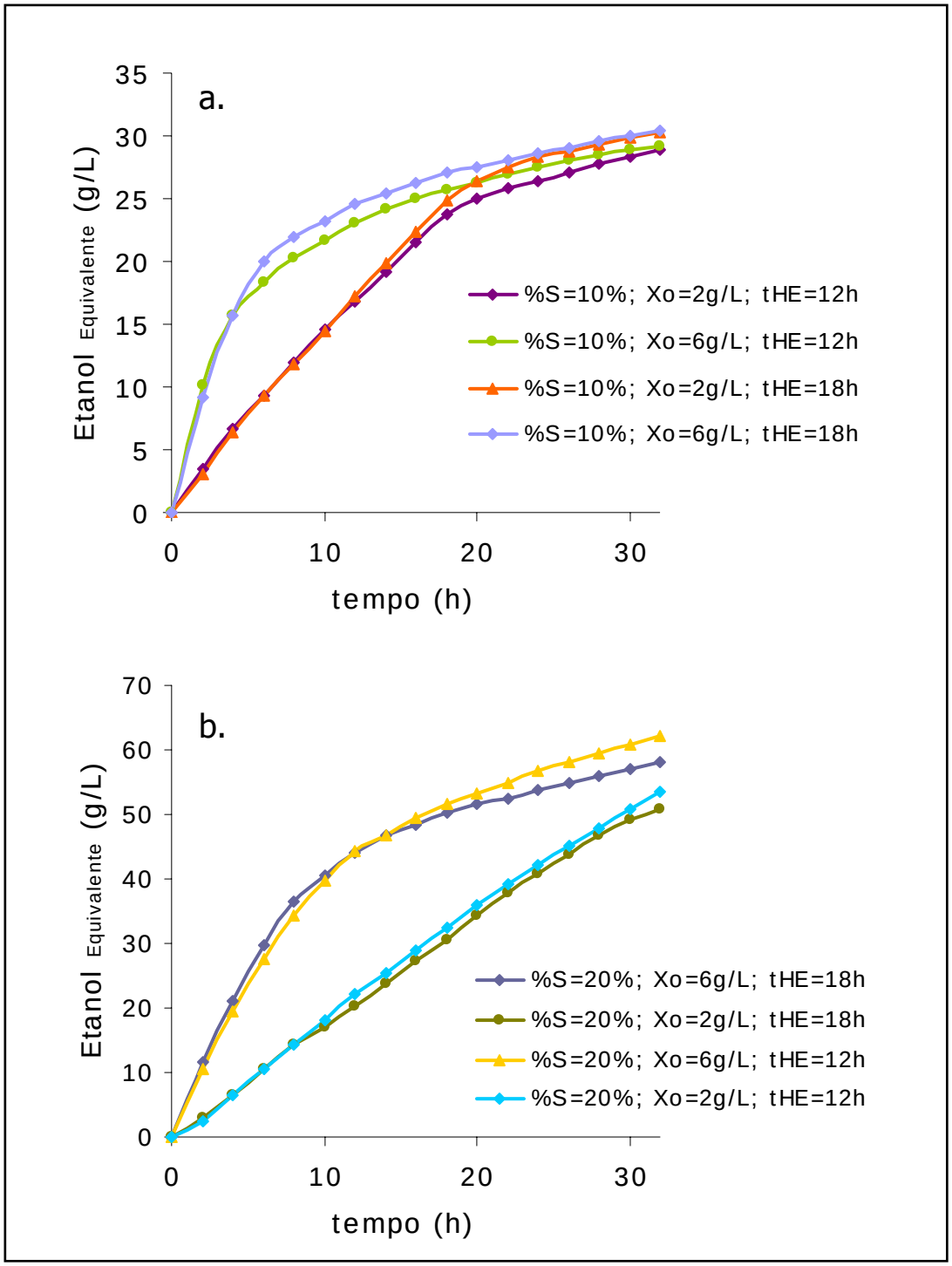


Figura 5.28. Perfis cinéticos para o processo SSF. Processos realizados com um teor de sólidos de **(a)** 10% (m/v) e **(b)** de 20%(m/v)

A concentração final de etanol foi influenciada principalmente pelo teor de sólido no meio. Porém, a concentração de inóculo aprsentou uma importância significativa no comportamento dos perfis do processo SSF. Uma alta concentração celular no início do processo SSF fez com que a taxa de consumo da glicose disponível ao se iniciar o processo SSF fôsse maior (Figura 5.29). De acordo com os resultados cinéticos, obsevou-se uma forte relação entre a concentração da levedura e a taxa enzimática de liberação da glicose da matriz celulósica. Inicialmente, em qualquer um dos experimentos, existiam concentrações altas de glicose que atendiam à demanda exercida pela levedura nas duas concentrações avaliadas. Isto fez com que tanto a taxa de produção de etanol, assim como o tempo de fermentação, fôssem diretamente dependentes da quantidade de levedura presente no meio. Porém, depois de transcorridas algumas horas, a curva de produção de etanol apresentou uma mudança marcante em sua inclinação. Essa mudança não estava mais relacionada com a concentração de levedura no meio e sim com a taxa de liberação de glicose.

A inclinação do perfil foi maior nos experimentos onde a concentração de inóculo foi de 6g/L, independente da concentração de sólido. Para as fermentações inoculadas com 2g de células/L, observa-se uma inclinação menos acentuada quando o teor de sólido foi de 10%, mas para o teor de sólido de 20% a mudança na inclinação desapareceu, o que sugere que a quantidade de levedura utilizada como inóculo é suficiente para consumir a glicose na taxa em que está sendo liberada pelas enzimas celulolíticas.

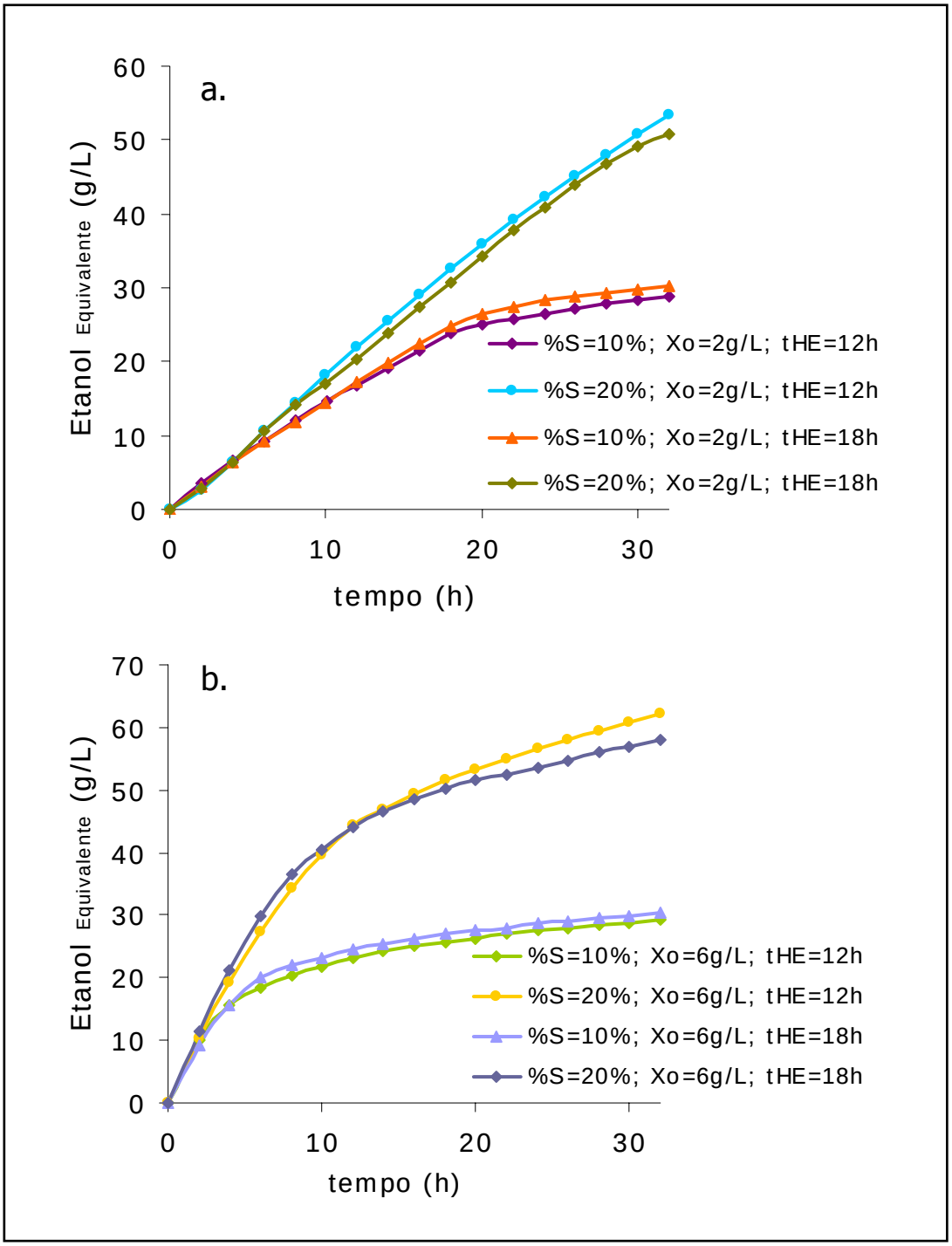


Figura 5.29. Perfis cinéticos para o processo SSF. Processos realizados com inóculo **(a)** de 2g/L e **(b)** de 6g/L

A baixa concentração de levedura utilizada no processo SSF é um fator comum entre os trabalhos reportados na literatura (Sassner *et al*, 2006; Linde *et al*, 2006; Wingren *et al*, 2005; Alkasrawi, 2002). Os valores citados na literatura não estão longe dos utilizados neste trabalho, ressaltando a importância do equilíbrio que deve existir entre a carga enzimática e a concentração de levedura para aumentar a eficiência e diminuir os custos do processo.

No momento em que a levedura conseguiu consumir a totalidade da glicose disponível no meio, o processo SSF passou a ser limitado pela taxa de liberação de glicose imposta pelas enzimas celulolíticas. Vale ressaltar que a taxa de liberação de glicose é maior a 47°C (temperatura na qual é realizada a pré-hidrólise enzimática), do que na temperatura na qual é realizado o processo SSF (37°C). A estratégia de se aumentar a temperatura não se aplica ao processo SSF, já que a produção de etanol seria afetada consideravelmente, tendo em vista que nesta temperatura a atividade microbiana ficaria comprometida.

Ao se realizar a análise estatística dos resultados do planejamento, observou-se como a porcentagem de sólido continuou sendo o fator com o maior efeito, sendo este o único fator que apresentou significância estatística (Figura 5.30) (Barros Neto *et al.*, 1995; Barros Neto *et al.*, 2001; Montgomery, 2001; Rodrigues & Iemma, 2005).

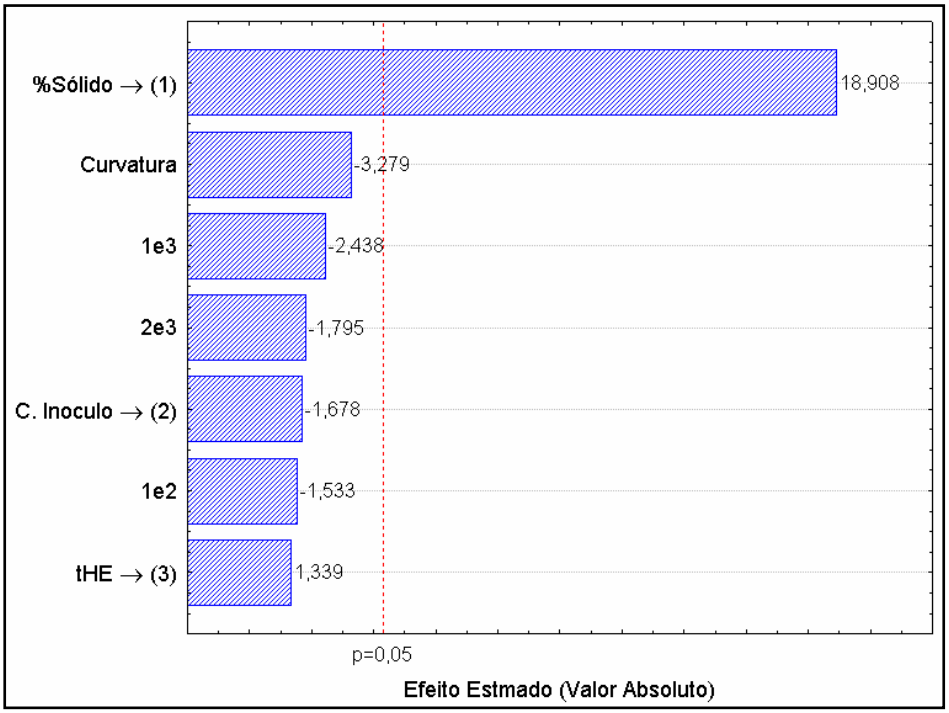


Figura 5.30. Gráfico de Pareto para a variável de resposta concentração de etanol (g/L)

No que diz respeito aos outros efeitos, observou-se que, para este caso, a interação entre a concentração de inóculo e o tempo de hidrólise enzimática deixou de ser significativa, o que o diferencia este planejamento do planejamento discutido anteriormente. De forma similar ao planejamento anterior, a curvatura foi analisada, observando-se que, para as novas faixas avaliadas, não houve significância estatística. O valor do coeficiente de correlação (R^2) do modelo (99,4%), aliado à falta de significância estatística da curvatura, permitem considerar que, para esta série de experimentos, o modelo de primeira ordem com termos de interação representa os resultados experimentais. Cabe notar que os fatores apresentados na análise estatística realizada pelo método de Fisher (ANOVA), Tabela 5.10, concordam com os apresentados na análise realizada pelo método baseado na estatística *t de Student* (gráfico de Pareto).

Tabela 5.10. Análise de variância (Tabela de ANOVA)

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_o	Valor do *p-level*
Curvatura	35,367	1	35,367	10,756	0,088
%Sólido (1)	1175,585	1	1175,585	357,523	0,003
C. Inóculo (2)	9,262	1	9,262	2,817	0,235
t_{HE} (3)	5,896	1	5,896	1,793	0,312
1 e 2	7,733	1	7,733	2,351	0,264
1 e 3	19,550	1	19,550	5,945	0,134
2 e 3	10,599	1	10,599	3,223	0,214
Falta de Ajuste	0,243	1	0,243	0,073	0,811
Erro Puro	6,576	2	3,288		

O comportamento da variável de resposta frente aos três fatores avaliados é mostrado nas superfícies de resposta da Figura 5.31. Nestas figuras observa-se como o modelo se ajusta apropriadamente aos resultados experimentais e como a variável de resposta é fortemente influenciada pelos níveis da porcentagem de sólido.

Com base na análise estatística realizada sobre os resultados do planejamento experimental, conclui-se que o processo SSF pode ser realizado no nível máximo de teor de sólido (20%), na concentração mínima de inóculo (2g/L) com um tempo máximo de pré-hidrólise enzimática de 12h. Porém, como se discutiu nas análises dos perfis cinéticos gerados para cada processo SSF, a concentração de inóculo de 6 g/L permitiu uma maior taxa de produção no início do processo, razão pela qual, para os experimentos posteriores, será esta a concentração de inóculo a ser utilizada.

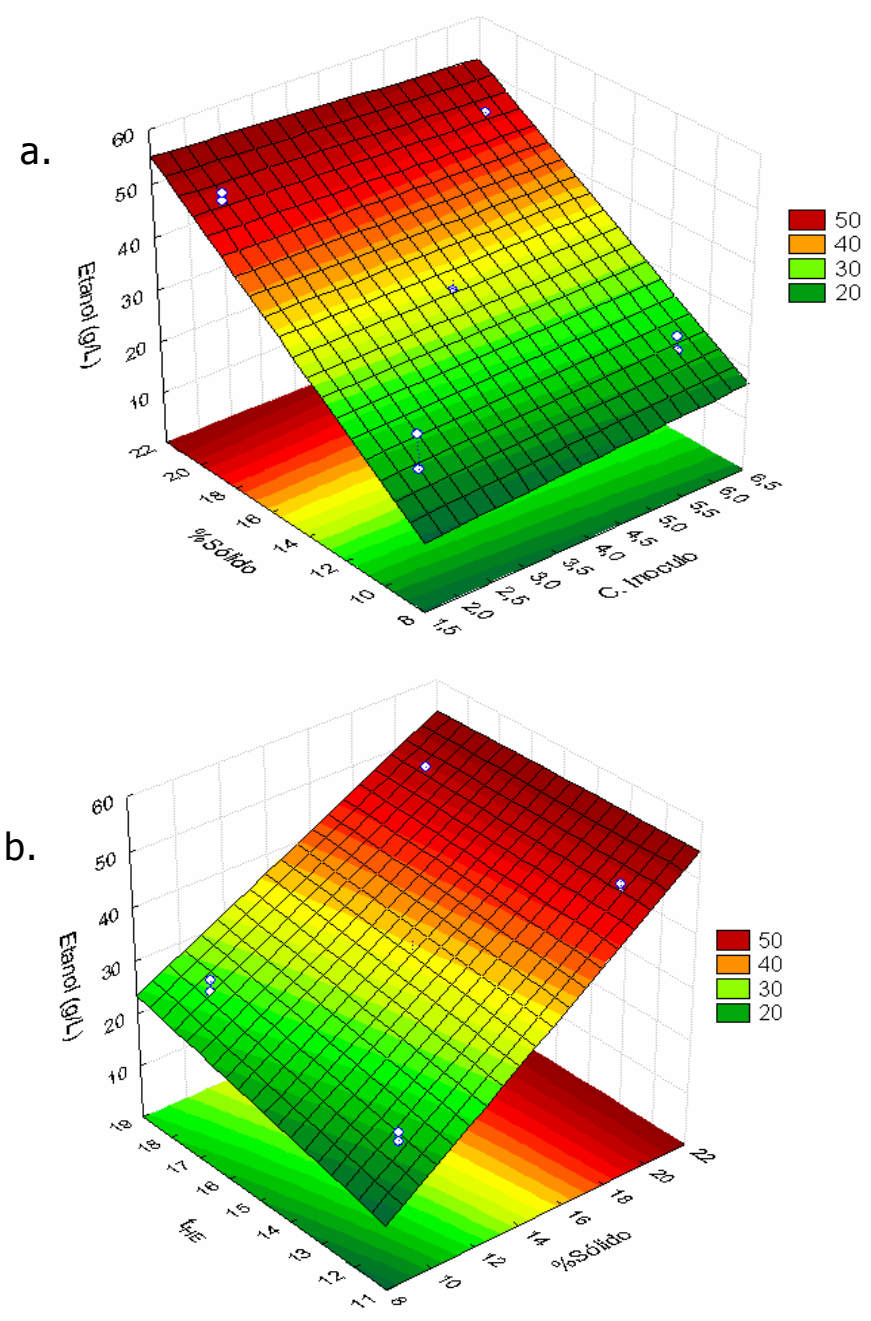


Figura 5.31. Superfícies de Resposta, **(a)** Concentração de inóculo vs %Sólido (m/v); **(b)** % Sólido (m/v) vs Tempo de hidrólise enzimática

Para validar a conclusão obtida na análise estatística da influência dos fatores avaliados, foi realizado um experimento em biorreator nas condições determinadas como adequadas para o processo (12 horas de pré-hidrólise, 2g/L de células e um teor de sólido de 20% (m/v)). O perfil cinético pode ser observado na Figura 5.32.

De acordo com a cinética do processo SSF pode-se deduzir que um tempo de 12 horas foi demasiado para o processo de pré-hidrólise enzimática, pois se pode observar claramente que, entre 8 e 12 horas, a quantidade de glicose é praticamente constante, o que sinaliza para uma redução de 4 horas de hidrólise. Tanto a estagnação da concentração de celobiose depois de 4 horas de pré-hidrólise assim como a desaceleração gradual na liberação de glicose, sendo mais perceptível após a sexta hora de pré-hidrólise, denotaram haver inibição das enzimas exo-glucanases e β-glucosidases, as quais foram reativadas quando as leveduras foram inoculadas.

A inibição das enzimas celulolíticas, causada pela glicose e a celobiose, começou 8 horas após o início da pré-hidrólise enzimática; concordando com o exposto na análise estatística do planejamento, mostrando que 12 horas de pré-hidrólise enzimática foi um tempo superior ao necessário para que este fator fosse significativo à produção de etanol.

Apesar dos resultados, um tempo de 12 horas de pré-inóculo no trabalho experimental foi adotado. Esta decisão baseou-se na estabilidade dos açúcares durante as 4 últimas horas de pré-hidrólise enzimática, facilitando assim a experimentação em laboratório.

A concentração de etanol começou a ser constante após 42 horas de processo total (pré-hidrólise e SSF), o que permitiu a diminuição do tempo total do processo em 38 horas, aumentando os valores de produtividade do processo.

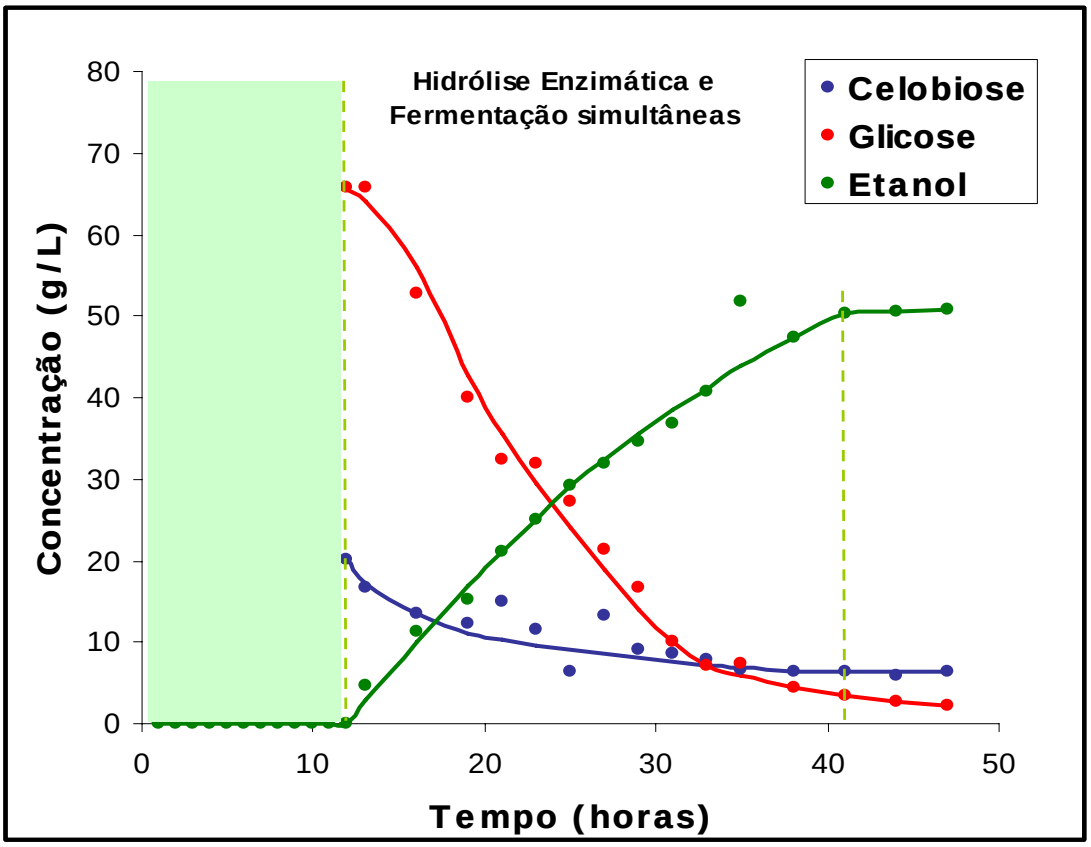


Figura 5.32. Cinética do processo SSF nas condições indicadas pelo planejamento experimental

De acordo com a literatura, um aumento no teor de sólido diminui a conversão de celulose a glicose (Lu *et al.*, 2002; Menezes & Aguiar, 2002; Vlasenko *et al.*, 1997; Varga *et al*, 2002; Pan *et al.*, 2005; Berlin *et al.*, 2006; Ferrer *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2002; Sewalt *et al.*, 1997). Este mesmo comportamento foi observado nos resultados do planejamento experimental realizado no presente estudo da hidrólise

enzimática. Os menores teores de sólido (2%) levaram a uma maior conversão (70%, considerando que o cálculo de conversão foi realizado com base no sólido total inicial e não na concentração de celulose inicial) com uma carga enzimática de 30 FPU/g. Os experimentos reportados por outros autores que obtiveram conversões acima deste valor, foram realizados com uma carga enzimática maior e em tempos de hidrólise enzimática de 72 horas (Lu *et al.*, 2002; Vlasenko *et al.*, 1997; Varga *et al*, 2002; Pan *et al.*, 2005; Ferrer *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2002).

No que concerne à concentração de etanol, a literatura, no que se refere à hidrólise enzimática, visa o aumento da conversão, razão pela qual se reportam teores baixos de sólido (uma média de 5%), resultando em baixas concentrações de produto. Como pode ser observado, na Tabela 3.8, os registros de concentração de etanol são baixos e bem menores aos alcançados neste estudo. Como sinalizado pelo planejamento experimental, altos teores de sólido resultam numa diminuição dos valores da conversão, mesmo assim, o objetivo da pesquisa é o aumento na concentração de etanol, o que sugere a necessidade de se trabalhar com valores ainda maiores de teor de sólido.

5.6. AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DE *CELULIGNINA* OBTIDA NA HIDRÓLISE ÁCIDA COM 1% E 3% (v/v) DE ÁCIDO SULFÚRICO

A mudança na concentração de ácido sulfúrico nas condições da hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar para a extração e hidrólise da hemicelulose pode gerar mudanças na composição da *celulignina* utilizada como matéria-prima no processo SSF (Betancur, 2005), o que tornou necessário avaliar como estas mudanças afetariam o processo SSF estudado até o momento.

Duas fermentações foram realizadas nas mesmas condições, variando unicamente o substrato. Uma das fermentações continha *celulignina* obtida da hidrólise ácida realizada com ácido sulfúrico 1% (v/v) e a outra continha *celulignina* proveniente da hidrólise com ácido sulfúrico em concentração de 3% (v/v). Para os valores reais da concentração de etanol no meio fermentado (Tabela 5.11), obteve-se uma variação da ordem de 10%. A Figura 5.33 apresenta os perfis cinéticos obtidos em cada um dos experimentos realizados.

O processo SSF realizado com *celulignina* obtida na hidrólise ácida com concentração de H_2SO_4 de 1% (v/v) resultou em uma concentração de etanol 10% superior àquela obtida com a *celulignina* oriunda do pré-tratamento com 3% de H_2SO_4. Além de apresentar uma concentração maior de etanol, a *celulignina* proveniente da hidrólise com ácido sulfúrico a 1% (v/v) facilitou o processo de lavagem depois do pré-tratamento com NaOH, uma vez que fibras não sofreram uma diminuição de tamanho tão acentiado, visualmente, como na hidrólise com ácido sulfúrico a 3% (v/v).

Tabela 5.11. Resultados da avaliação de *celulignina* obtida com 1% (v/v) e 3% (v/v) de ácido sulfúrico

Experimento	Etanol (g/L)
Celulignina 1% (v/v),	52,79
Celulignina 1% (v/v) [R]	53,12
Celulignina 3% (v/v)	48,40
Celulignina 3% (v/v) [R]	47,60

R: Réplica

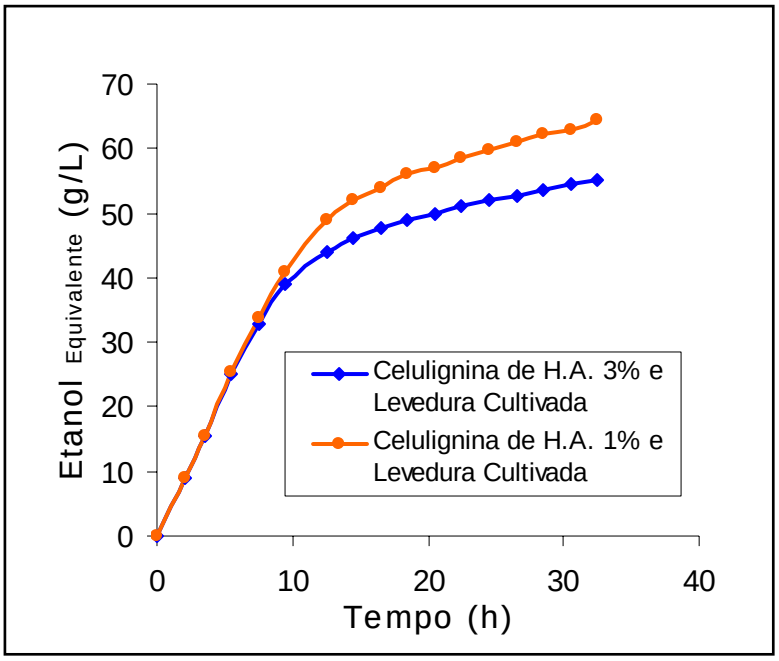


Figura 5.33. Perfis cinéticos do processo SSF para avaliação do processo SSF com a *celulignina* resultante da hidrólise com ácido sulfúrico 1% e 3% (v/v)

5.7. SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO COM FONTES DE NITROGÊNIO E SAIS

As fontes de nitrogênio avaliadas foram: extrato de levedura, uréia e sulfato de amônio, em uma concentração de 3 g/L. Além das fontes de nitrogênio incluiu-se, na suplementação do meio, 40 mL/L de uma solução de sais minerais e ácido cítrico, recomendada para fermentações com leveduras (Du Prerez *et al.*, 1985). Estes suplementos foram avaliados individualmente e por combinações de cada fonte de nitrogênio com a solução de sais. As avaliações foram realizadas para as duas *celuligninas* disponíveis (*celulignina* obtida na hidrólise com ácido sulfúrico 1% e a *celulignina* oriunda da hidrólise com 3% de H_2SO_4). Nas Figuras 5.34 e 5.35 são mostradas as cinéticas para cada experimento

num tempo de 27 horas de fermentação. Os resultados das concentrações finais de álcool são apresentados na Tabela 5.12.

Tabela 5.12. Resultados da avaliação de fonte de nitrogênio e sais para dois tipos de *celulignina*

Suplemento	**Etanol (g/L)**	
	Celulignina da Hidrólise com ácido 3%(v/v)	*Celulignina* da Hidrólise com ácido 1%(v/v)
Sem Sais; Sem Fonte Nitrogênio	47,76	49,25
Sais	44,91	40,26
Extrato de Levedura	49,24	52,46
Uréia	53,35	53,94
Sulfato de Amônio	53,27	54,26
Sais + Extrato de Levedura	47,71	48,53
Sais + Uréia	46,77	49,03
Sais + Sulfato de Amônio	44,73	52,02

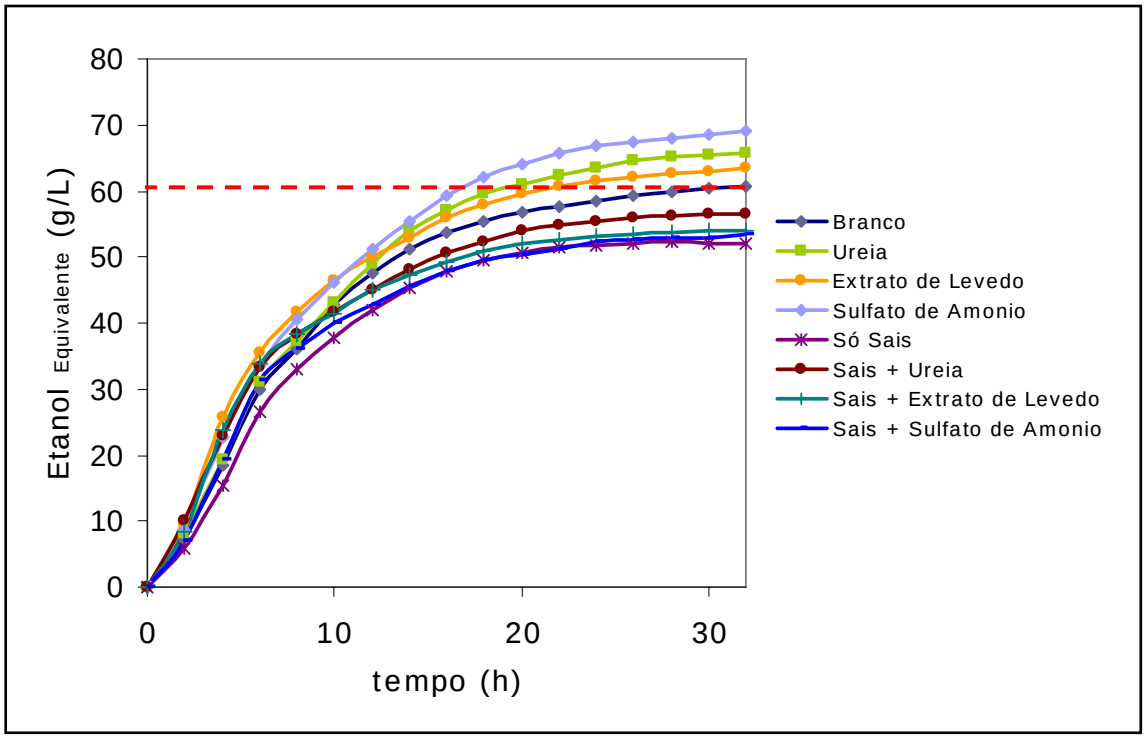


Figura 5.34. Avaliação das fontes de nitrogênio e sais no processo SSF com *celulignina* proveniente da hidrólise ácida com H_2SO_4 3% (v/v)

Assim como os resultados reais (resultados cromatográficos da Tabela 5.12.) os perfis gerados pelo etanol equivalente indicam, nos dois casos, a uréia e o sulfato de amônio como os melhores suplementos do meio de fermentação. Os sais parecem não exercer um efeito positivo sobre o processo, o que foi evidenciado tanto nos resultados experimentais quanto nos perfis cinéticos dos processos SSF, obtidos no uso do fermentômetro (Tabela 5.12, Figuras 5.34 e 5.35).

A uréia oferece vantagens, pois, além de produzir um aumento significativo na produção de etanol, é de baixo custo, fácil aquisição e freqüente uso industrial. Desta forma, a uréia foi selecionada como suplemento a ser utilizado no processo SSF.

A maioria dos artigos reporta a suplementação do meio do processo SSF com alguns sais e fontes de nitrogênio (extrato de levedo, $(NH_4)_2SO_4$, fosfatos, $MgSO_4$, são os suplementos mais freqüentes). Porém, unicamente Martin *et al.* (2002); eram o único trabalho que realizava uma comparação entre a ausência e a presencia de suplementos (extrato de levedo, $(NH_4)_2HPO_2$, NaH_2PO_4 e $MgSO_4$) encontrando uma sutil diferença no comportamento da levedura no processo fermentativo. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos nesta avaliação.

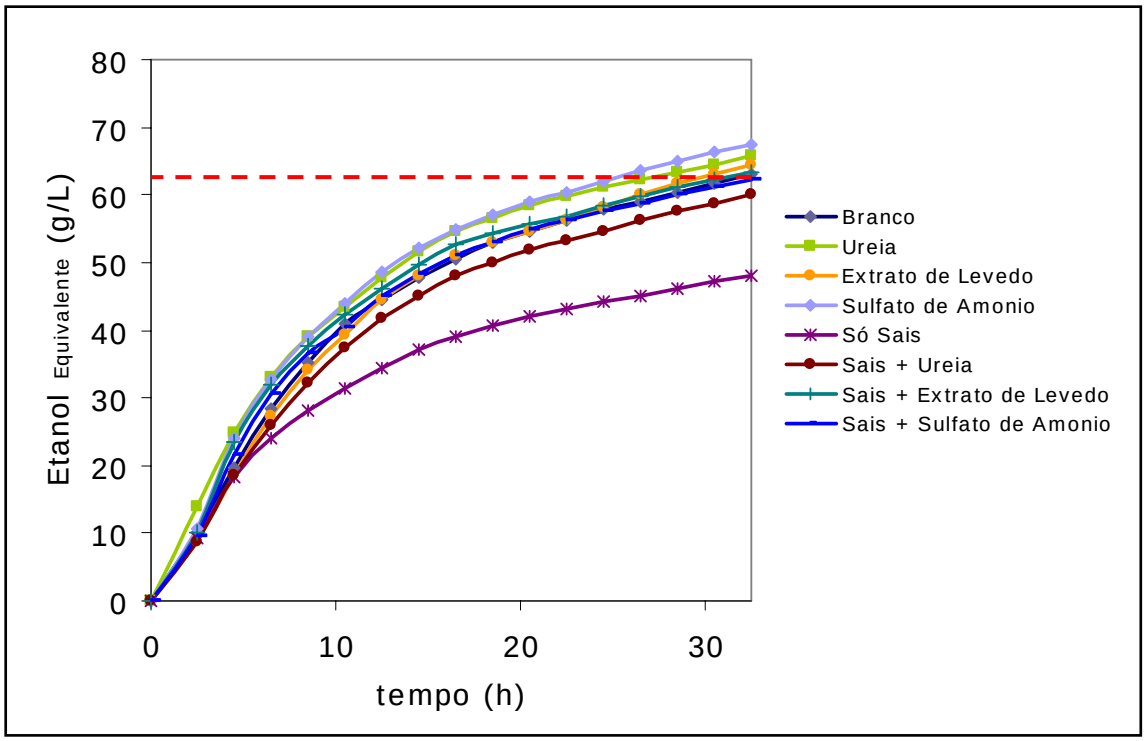


Figura 5.35. Avaliação das fontes de nitrogênio e sais no processo SSF com *celulignina* proveniente da hidrólise ácida com H_2SO_4 1% (v/v)

5.8. INFLUÊNCIA DO TAMANHO DE PARTÍCULA NO PROCESSO SSF

Segundo a literatura, um aumento na área superficial do sólido facilitaria o ataque enzimático à celulose (Brown, 1996; Cao, 2002; Cao, 2004). Porém, os resultados obtidos na avaliação de três diferentes tamanhos de partícula - *celulignina* não cominuída (CL 2 mm) com um tamanho médio de partícula de 2 mm (tal como sai do processo de hidrólise ácida e posterior deslignificação); *celulignina* com tamanho de partícula menor que 0,25 mm (CL 0,25 mm) e *celulignina* com tamanho de partícula menor que 0,50 mm (CL 0,5 mm) - não foram muito diferentes, tanto no comportamento cinético (Figura 5.36), como nos valores finais da concentração de etanol no meio (Tabela 5.13).

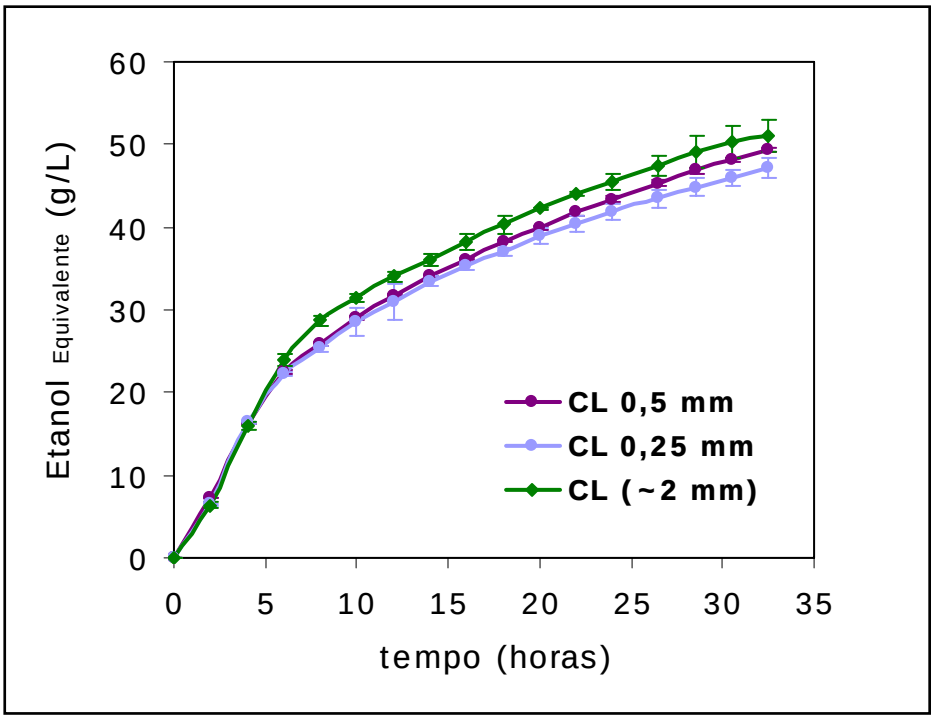


Figura 5.36. Perfis cinéticos do processo SSF na avaliação de diferentes tamanhos de partícula do substrato sólido

De acordo com estes resultados, podemos dispensar a etapa de cominuição quando a *celulignina* tiver um tamanho de partícula inferior a 2 mm dentro do um processo industrial.

Tabela 5.13. Resultados da avaliação de diferentes tamanhos de partícula do substrato sólido

Suplemento	**Etanol (g/L)**
Celulignina não cominuída (~2 mm)	51,49
Celulignina não cominuída (~2 mm) [R]	48,89
Celulignina com tamanho de partícula menor de 0,25 mm	46,95
Celulignina com tamanho de partícula menor de 0,25 mm [R]	47,06
Celulignina com tamanho de partícula menor de 0,50 mm	48,87
Celulignina com tamanho de partícula menor de 0,50 mm [R]	47,95

R: Réplica

5.9. COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO, COMO INÓCULO NO PROCESSO SSF, DA LEVEDURA COMERCIAL PRENSADA E A LEVEDURA ISOLADA E PROPAGADA PREVIAMENTE.

Para os experimentos realizados até esta etapa do trabalho, utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae,* isolada do fermento de panificação *Fleischmann* e propagada em meio sintético para ser utilizada como inóculo. Com o objetivo de se reduzir o consumo de nutrientes utilizados na preparação dos meios de propagação, avaliou-se o desempenho de levedura comercial (prensada) utilizada diretamente no processo SSF, nas mesmas concentrações iniciais de células (em massa seca).

Os resultados de este estudo comparativo estão apresentados na Tabela 5.14 e na Figura 5.37. Observou-se não haver diferenças pronunciadas ao se empregar um ou outro procedimento de inoculação. Desta feita, os experimentos que foram realizados posteriormente utilizaram como inóculo levedura comercial prensada, evitando assim, o gasto desnecessário de reagentes na propagação das células.

Tabela 5.14. Resultados da avaliação de levedura comercial *Fleischmann* como inóculo

Suplemento	Etanol (g/L)
Celulignina de ácido 3% (v/v) - Levedura Cultivada	48,40
Celulignina de ácido 3% (v/v) - Levedura Cultivada[R]	47,60
Celulignina de ácido 3% (v/v) - Levedura Comercial	49,63
Celulignina de ácido 3% (v/v) - Levedura Comercial[R]	53,64

R: Réplica

CAPÍTULO 6

6.1. CONCLUSÕES

1. Os pré-tratamentos avaliados permitiram a remoção de parte da lignina das fibras da *celulignina*, aumentando a acessibilidade das enzimas do complexo celulolítico à celulose, melhorando o processo de hidrólise enzimática.

2. Em geral, todos os pré-tratamentos avaliados tiveram efeitos positivos, com diferentes magnitudes. Porém, o pré-tratamento que proporcionou o maior aumento na acessibilidade da celulose ao ataque enzimático foi realizado nas seguintes condições: solução de NaOH 4% (m/v), em uma relação sólido:líquido de 1:20, mantida em 121°C, por

um período de 30 minutos. O sólido proveniente deste pré-tratamento foi denominado de *celulignina G*. Neste processo conseguiram-se aumentos na concentração de glicose, ao final da hidrólise enzimática, de 2,05; 3,24 e 2,40 vezes para cada consórcio enzimático Spezyme®CP, GC 220 e Celluclast 1.5L FG, respectivamente, em comparação com os resultados obtidos na hidrólise enzimática da *celulignina* sem nenhum pré-tratamento.

3. Considerando que os resultados obtidos na primeira investigação da hidrólise enzimática não constituíram estudos de otimização, pode-se concluir que os valores de conversão de celulose em glicose foram significativos (40% com Spezymes®CP, 47% com GC 220, 23% com Celluclast 1.5 L FG) e sinalizaram desdobramentos importantes nas etapas seguintes de otimização.

4. Foi evidente a superioridade do preparado enzimático GC 220 da *Genencor international* na hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados, tanto nas amostras coletadas em 24 como em 48 horas, razão pela qual este preparado enzimático foi escolhido para ser usado nos estudos posteriores de pré-hidrólise enzimática e do processo SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*).

5. Foi possível concluir que o hidrolisado, proveniente do processo enzimático da *celuligninaG*, foi facilmente fermentável pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol, alcançando concentrações de 30 g/L em um tempo de 10 horas de fermentação e, conseqüentemente, gerando uma produtividade volumétrica de 3 g/L.h, valor que não difere muito daqueles valores obtidos em fermentações convencionais de etanol a partir de caldo de cana no Brasil (5-8 g/L.h). É importante ressaltar que o ensaio de fermentabilidade foi realizado em condições de processo não otimizadas.

6. O modelo quadrático gerado na análise estatística da otimização do processo de hidrólise enzimática ajustou-se adequadamente ao comportamento das variáveis de resposta (concentração de glicose e conversão de *celluligninG* a glicose), quando os fatores - temperatura, carga enzimática e teor de sólido - foram variados dentro dos intervalos especificados.

7. As condições de hidrólise enzimática que levaram à maior concentração de glicose (58,40 g/L) foram: temperatura de 47°C, carga enzimática de 25,6 FPU/g *celuligninaG* e teor de sólido de 10% (p/v). No caso da conversão de *celuligninaG* em glicose, as condições de temperatura de 43°C, carga enzimática de 24,4 FPU/g *celuligninaG* e teor de sólido de 2% (p/v) resultaram no valor máximo de 67%. A função *Desirability global* estabeleceu as condições (temperatura de 47°C, carga enzimática de 25,9 FPU/g *celluligninG* e teor de sólido de 10% (p/v)) nas quais ambas as variáveis de resposta foram maximizadas simultaneamente.

8. A fermentação do hidrolisado enzimático da *celuligninaG*, proveniente da hidrólise ácida do bagaço de cana de açúcar, apresentou-se como uma excelente alternativa para a produção de etanol combustível de resíduos lignocelulósicos.

9. Dos fatores avaliados para o processo SSF pode-se concluir que o tempo de hidrólise enzimática, na faixa de 12 a 24 horas, não exerceu uma influência significativa sobre o processo SSF, o que conduziu a uma redução no tempo de pré-hidrólise enzimática de 12 para 8 horas.

10. O teor de sólido, avaliado entre 10% e 20% (m/v), destacou-se como o fator mais importante no processo SSF para se obterem altas

concentrações de etanol. Em termos gerais, um aumento na concentração do teor de sólido também eleva a concentração de etanol.

11. Embora a concentração celular tenha se mostrado pouco influente no processo SSF, as cinéticas realizadas em fermentômetros permitiram observar a importante relação existente entre concentração de células e a carga enzimática. Esta relação admitiu a existência de valores, para estas duas variáveis, que levaram a um equilíbrio entre a quantidade de açúcares liberados pelas enzimas e os açúcares consumidos pelas leveduras.

12. O fator pH, na faixa avaliada (5-6), não apresentou uma influência importante no comportamento do processo de hidrólise enzimática para nenhuma das duas variáveis de resposta investigadas (concentração de glicose e conversão de *celuligninaG* a glicose).

13. A suplementação do meio de cultivo com fontes de nitrogênio e sais minerais não resultou em um aumento significativo na concentração final de etanol. Porém, tanto o uso da uréia bem como do sulfato de amônio resultaram em melhorias ao processo.

14. A mudança na concentração de ácido sulfúrico de 3% (v/v) para 1%(v/v) no pré-tratamento ácido, processo no qual é retirada a fração hemicelulósica e produzida a *celulignina*, incrementou em 10% a produção de álcool no sistema SSF.

15. A adição de β-glucosidase permitiu diminuir a carga enzimática do consórcio GC220, empregada no processo, aumentando a quantidade de glicose liberada no mesmo intervalo de tempo. Adicionalmente, a quantidade de celobiose, ao longo do processo SSF, diminuiu em quase

50%, quando comparada com a celobiose presente ao longo do processo SSF, no qual foi utilizado somente o consórcio enzimático GC220.

16. Experimentalmente foi comprovado que é possível diminuir a quantidade de hidróxido de sódio empregado no processo de deslignificação, até 1% (m/v), reduzindo consideravelmente os custos do processo de produção de álcool a partir de material lignocelulósico.

17. O aumento no teor de sólido no processo SSF, como fator de maior influência para incrementar a concentração final de etanol, foi uma estratégia adequada para alcançar concentrações de 70 g/L de etanol, valor próximo ao considerado adequado para que o processo de destilação seja energética e economicamente viável.

18. A celulose, presente no bagaço de cana-de-açúcar, constitui uma excelente fonte de carboidratos para a produção de etanol por meio do processo SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*), empregando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

6.2. SUGESTÕES

1. Desenvolver metodologias que permitam caracterizar rapidamente as frações dos compostos lignocelulósicos, facilitando a obtenção dos rendimentos nos processos empregados.

2. Realizar estudos sobre a caracterização dos componentes da lignina, os quais facilitem o seu emprego para a produção de metabólitos de maior valor agregado dentro do conceito de biorrefinaria.

3. Estudar diferentes aplicações dos resíduos da deslignificação, de modo a tornar esta etapa menos agressiva ao ambiente.

4. Realizar uma avaliação econômica que permita discernir sobre a factibilidade e o retorno financeiro que teria o uso do sulfato de amônio ou a uréia, como fonte de nitrogênio, frente ao aumento da produção de etanol.

5. Estudar a relação existente entre a carga enzimática e a concentração celular que aumentem a produtividade e diminuam o tempo do processo SSF.

6. Realizar experimentos axiais necessários para completar o planejamento composto central (Montgomery, 2001) para verificar a influência dos termos quadráticos dos fatores: carga enzimática de GC220 e β-glucosidase sobre a concentração final de etanol.

CAPÍTULO 7

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSUL, M.G.; GHULE, J.E.; SHAIKH, H.; SINGH, R.; BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V & VARMA, A.J. (2005) Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. Carbohydrate Polymers, v. 62, p. 6-10.

ALKASRAWI, M.; GALBE, M. & ZACCHI, G. (2002) Recirculation of Preocess Streams in Fuel Ethanol Production from Softwood Based on SSF. Applied Biochemistry and Biotechnology, v 98-100, p. 849-861.

ALRIKSSON, B.; SJÖDE, A.; NILVEBRANT, N. & JÖNSSON, L.J. (2006) Optimal Conditions for Alcaline Detoxification of Diluite-Acid Lignocellulose Hydrolysates. Applied Biochemistry and Biotechnology, v 129-132, p. 599-611.

ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica - (2005) Atlas de Energia Elétrica do Brasil. Brasília, 2 edição, p. 243. Disponível em: http://www.aneel.gov.br. Acesso: jun/2006.

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

ASENJO, A.J. & MERCHUK, J. (1995) Bioreactor System Design. Editor W. Courtney McGregor. ISBN: 0-8247-9002-2. United States of America.

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.

BALLESTEROS, I.; NEGRO, M.J.; OLIVA, J.M.; CABAÑAS, A.; MANZANARES, P. & BALLESTEROS, M. (2006) Etanol Production from Steam-Explosion Pretrated Wheat Straw. Applied Biochemistry and Biotechnology, v 129-132, p. 496-508.

BARROS NETO, B.; SCAEMNINIO, I.S. & BRUNS, R.E. (1995) Planejamento e Otimização de Experimentos. Editorial UNICAMP. São Paulo. Brasil.

BARROS NETO, B.; SCAEMNINIO, I.S. & BRUNS, R.E. (2001) Como Fazer Experimentos, Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria. Editorial UNICAMP. São Paulo. Brasil.

BERG, A. (2006) Región tiene materia prima para biorrefinería. Diario el sur. Disponível em: http://www.elsur.cl. Concepción, Chile. Acesso: Junho/2007

BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBURN, D.; MAXIMENKO, V.; BURA, R.; MARKOV, A.; SKOMAROVSKY, A.; OKUNEV, O.; SOLOVIERA, I. & SADDLER J.N. (2006) Evalualuation of Cellulase Preparation for Hydrolysis of Hardwood

Substrates. . Applied Biochemistry and Biotechnology, v 129-132, p. 528-545.

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.

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

BIRD, R.B.; LIGHFOOT, E.N. & STEWART, W. (1982) Fenómenos de transporte : un estudio sistemático de los fundamentos del transporte de materia, energía y cantidad de movimiento. ISBN: 84-291-7050-2. España. Reverte.

BJÖRKLUND, I.; LARSSON, S.; JÖNSSON, L.F.; REIMANN, A. & NILVEBRANT, N.O. (2002) Treatment with Lignin Residue. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 98-100, p. 563-575.

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.

BROWN, L. & TORGET, R. (1996) Enzymatic Saccharfication of Lignocellulosic Biomass. National Renewable Energy Laboratory. v. 37, p. 191–226.

CAO, Y. & TAN, H. (2002) Effects of Cellulase on the Modification of Cellulose. Carbohydrate Research, v. 337, p. 1291–1296.

CAO, Y. & TAN, H. (2004) Structural Characterization of Cellulose with Enzymatic Treatment. Journal of Molecular Structure, v. 705, p. 189-193.

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

CARAMEZ, M. (1999) Produção de Endoxilanases 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.

COM - Comissão das Comunidades Européias. Estratégia da União Européia no domínio dos biocombustíveis. Bruxelas, p. 31. Disponível em: http://ec.europa.eu. Acesso: Abr/ 2006.

COPERSUCAR: Centro de tecnologia canavieira. Disponível em: http://www.copersucar.com.br. Acesso: Maio/2007

Copyright POWER (2007) Petróleo, Eletricidade e Energias Alternativas. Biblioteca Virtual de Engenharia de Petróleo. Disponível em: http://www.dep.fem.unicamp.br/novabv. Acesso: Agosto/2007

CRUEGER, W; CRUEGER, A. (1993). Biotecnología: Manual de Microbiologia 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, Capitulo III, p. 45-106.

DANESI, E.D.G.; MIGUEL, A.S.M.; RANGEL-YAGUI, C.O.; CARVALHO, J.C.M. & PESSOA Jr., A. (2006) Effect of Carbon:Nitrogênio Ratio (C:N) and Substrate Source on Glucose-6-phosphate Dehydrogenase (G6PDH)

Production by Recombinant Saccharomyces cerevisiae. Journal of Food engineering, v. 75, p. 96-103.

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.

DOWE, N. & McMILLAN, J. (2000) SSF Experimental protocols: Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation. Biofuels Program (NREL). LAP-008. p. 1-22.

DU PREEZ, J.C.; KOCK, J.L.F.; MONTEIRO, A.M.T. & PRIOR, B.A. (1985) The Vitamin Requirements of Candida shehatae for Xylose Fermentation. FEMS Microbiology Letters, v. 28, n. 3, p. 271-275.

EIA - Energy Information Administration – department of Energy - EUA (2007). Official Energy Statistics from the U.S. Government. Disponível em: http://www.eia.doe.gov/. Acessado: Agos./2007.

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.

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./ 2006.

FERRER, A.; BYERS, F.M.; SULBARÁN-DE-FERRER, B.; DALE B.E. & AIELLO, C. (2002) Optimizing Ammonia Processsing Conditions to Enhance

Susceptibility of Legumes to Fiber Hydrolysis. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 98-100, p. 123-133.

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

FUKUSHIMA, R.S. e SAVIOLI, N.M.F. (2001) Correlação Entre Digestibilidade In Vitro da Parede Celular e Três Métodos Analíticos para a Avaliação Quantitativa da Lignina. Revista Brasileira Zootecnia, v. 30, n. 2, p.123-130.

GARCIA-APARICIO, M.P.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A.; OLIVA, J.M.; BALLESTEROS M. & NEGRO M. J. (2006) Effect of Inhibitors Released During Steam-Explosion Pretreatment of Barley Straw on Enzymatic Hydrolysis. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 129-132, p. 278-288.

GIDH, A.; TALREJA, D.; VINZANT, T.B.; WILLIFORD, T.C. & MIKELL, F. (2006) Detailed Analysis of Modifications in Lignin After Treatment with Cultures Screened for Lignin Depolymerizing Agents. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 129-132, p. 829-843.

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

GHOSH, P. & SINGH, A. (1993) Physicochemical and Biological Treatments for Enzymatic/Microbial Conversion of Lignocellulosec Biomass. Advanced and Applied Microbiology. v. 39, p. 295-332.

GODFREY, T. & WEST, S. (1996) Industrial Enzymology. Second Edition. The Macmillan Press Ltda. London.

GOLLAPALLI, L.E.; DALE, B.E. & RIVERS, D.M. (2002) Predicting Digestibility of Ammonia Fiber Explosion (AFEX)- Treated Rice Straw. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 98-100, p. 23-35.

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.

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.

JUNG, H.G.; VAREL, V.H.; WEIMER, P.J. & RALPH J. (1999) Accuracy of Klason Lignin and Acid Detergent Lignin Methods As Assessed by Bomb Calorimetry. Journal Agricultural Food Chemical. v. 47, p. 2005-2008.

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.

KLYOSOV, A.A. (1995a) Industrial Enzyme Engineering. Volume 1: Biomass conversion with cellulases. Disponível em: http://aklyosov.home.comcast.net. Acessado: Dezembro/ 2006.

KLYOSOV, A.A. (1995b) Industrial Enzyme Engineering. Volume 2: Principles of the enzymatic degradation of cellulose. Disponível em: http://aklyosov.home.comcast.net. Acesso: Dezembro/2005.

KNAUF, M. & MONIRUZZAMAN, M. (2004) Lignocellulosic Biomass Processing: A Perspective. International Sugar Journal, v. 106, p. 12-23.

KOSARIC, N.; VARDAR-SUKAN, F.; PIEPER, H.J. & SEEN, T. (2001) The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications. © WILEY-VCH Verlag GmbH, D-69469 Weinheim (Federal Republic of Germany).

KURABI, A.; BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBURN, D.; BURA, R.; ROBINSON, J.; MARKOV, A.; SADDLER, J. (2005) Enzymatic Hydrolysis of Steam-Exploded and Ethanol Organosolv-Pretreated Douglas-Fir by Novel and Commercial Fungal Cellulases. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 121-124, p. 219-230.

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

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: fev./2006.

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.

LEAL, M.R.L.V. (2004) Energia na indústria de açúcar e álcool: A cana como fonte de energia. Disponível em: http://www.nest.unifei.edu.br. Acesso: fev./2006.

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

LEE, R.L. (1996) Overview and Evaluation of Fuel Ethanol from Cellulosic Biomass: Technology, Economics, the Environment, and Policy. Energy Environment, v. 21, p. 403-465.

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.

LEVY, I.; SHANI, Z. & SHOSEYOV, O. (2005) Modification of Polysaccharides and Plant Cell Wall by Endo-1,4-glucanase and Cellulose-binding Domains. Biomolecular Engineering. v. 19, p. 17-30.

LINDE, M.; GALBE, M. & ZACCHI, G. (2006) Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Barley Straw. Lund University. 28th Symposum on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Nashville, Tennessee.

LOWRY, O.H. *et al.* (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. The Journal of Biological Chemistry, v. 193, n. 1, p. 265-275.

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.

LU, Y.; YANG, B.; GREGG, D.; SADDLER, J.N. & MANSFIELD, S.D. (2002) Cellulase Adsorption and an Evaluation of Enzyme Recycle During Hydrolysis of Steam-Exploded Softwood Residues. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 98-100, p. 641-653.

LU, C.; YOSHIMOTO, M.; TSUKUDA, N.; FUKUNAGA, K. & NAKAO, K. (2004) A Kinetic Study on Enzymatic Hydrolysis of a Variety of Pulps for Its Enhancement with Continuous Ultrasonic Irradiation. Biochemical Engineering Journal, v.19, p. 155–164.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2005) Plano nacional de agroenergia. Brasília: MAPA, p. 118. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br. Acesso: mar./2006.

MAIS, U.; ESTEGHLALIAN, A.R.; SADDLER, J.N. & MANSFIELD, D. (2002a) Enhancing the Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials Using Simultaneous Ball Milling. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 98-100, p. 815-831.

MAIS, U.; ESTEGHLALIAN, A.R. & SADDLER, J.N. (2002b) Influence of Mixing Regime on Enzymatic Saccharification of Steam-Exploded Softwood Chips. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 98-100, p. 463-471.

MAIORELLA, B.L.; BLANCH, H.N. & WIKE, C.R. (1983) Economic Evaluation of Alternative Ethanol Fermentation Process. Biotechnology and Bioengineering, v. 26, p. 1003-1024.

MAISTRO, M.C.M. e BARROS G.S.C. (2002) Relações Comerciais e de Preços no Mercado Nacional de Combustíveis. Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural (SOBER).

MARTIN, C.: GALBE, M.: NILVEBRANT, N. & JÖNSSON, L.J. (2002) Comparation of the Fermentability of Enzimatic Hydrolizates of Sugarcane Bagasse Pretreated by Steam Explosion Using Different Impregnating Agents. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 98-100, p. 699-715.

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.

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

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA (1996) Balanço de energia na produção de cana-de-açúcar e álcool nas usinas cooperadas – apêndice I: área agrícola, In: CONVENÇÃO SOBRE MUDANÇA DO CLIMA. Distrito Federal. Disponível em: http://www.mct.gov.br. Acesso: fev./ 2006.

MOISER, 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.

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.

MORIYA, R.Y.; GONÇALVES, A.R. & FARIA, F.P. (2005) Enzymatic Bleaching of Organosolv Sugarcane Bagasse Pulps with Recombinant Xylanase of the Fungus Humicola grisea and with Commercial Cartazyme HS Xylanase. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 121-124, p. 195-203.

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

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.

MUSSATO, S.I. & ROBERTO, C.I. (2004) Alternatives for Detoxification of Diluted-Acid Lignocellulosic Hydrolyzates for Use in Fermentative Processes: a Review. Bioresource Technology, v. 93, n. 1, p. 1-10.

NAE - Núcleo de Assuntos Estratégicos da Presidência da República. Biocombustíveis (2005) Cadernos NAE, Processos Estratégicos de Longo Prazo, n.2, p.233. Brasília. Disponível em: www.planalto.gov.br/secom/nae. Acesso: jul./2006.

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

NOVOZYMES. Disponível em: www.novozymes.com. Acesso: fev./2006.

OLSSON, L. & HAHN-HÄGERDAL, B. (1996) Fermentation of Lignocellulosic Hydrolisates 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 prducer´s committee. Av. Paulista, 2028-6th floor/São Paulo-Brasil. CEP:01310

ÖHGREN, H.; VEHMAANPERÄ, J.; SIIKA-AHO, M.; GALBE, M.; VIIKARI, L. & ZACCHI, G. (2007) High Temperature Enzymatic Prehydrolysis Prior to SSF of Steam Pretreated Corn Stover for Ethanol Production. Enzyme and Microbial Technology, v. 40, n. 4, p. 607-613.

ÖHGREN, K.; BENGTSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; GALBE, M.; HAHN-HÄGERDAL, B. & ZACCHI, G. (2006) Simultaneous Saccharification and Co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover

at high fiber content with Saccharomyces cerevisiae TMB3400. Journal of Biotechnology, in press.

PALMQVIST, E. & HAHN-HÄGERDAL, B. (2000a) Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates. I: Inhibition and Detoxification. Bioresource Technology, v. 74, p. 17-24.

PALMQVIST, E. & HAHN-HÄGERDAL, B. (2000b) Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates. II: Inhibitors and Mechanisms of Inhibition. Bioresource Technology, v. 74, p. 25-33.

PAN, X. et al. (2004) Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Steam-exploded Douglas Fir Wood by Alkali-Oxygen Post-treatment. Applied Biochemistry and Biotechnology. v. 113-116, p. 1103-1114.

PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D.J. & SADDLER, N.J. (2005) Strategies to Enhance the Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Softwood with High Residual Lignin Content. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.121-124, p. 1069-1079.

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

PAPATHEOFANUS, M.G; BILLA, E.; KOULLAS, D.P; MONTIES, B. & KOUKIOS, E.G. (1995) Two-Stage Acid-catalyzed Fractionaction of Lignocellulosic Biomass in Aqueous Ethanol Systems at Low Temperatures. Bioresourse Technology, v. 54, p. 305-310.

PARRY, N.J. et al. (2001) Biochemical Characterization and Mechanism of Action of a Thermostable ß-glucosidase Purified from Thermoascus aurantiacus. Biochemical Journal, v. 353, p. 117-127.

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

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

PEREIRA Jr., N. (2006) Palestra II: Biotecnologia de Lignocelulósicos e o contexto de Biorrefineria Associado. XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ). 24-27 Setembro de 2006.

PASQUINI, D.; PIMENTA, M.T.B.; FERREIRA, L.H. & CURVELO, A.A.S. (2005) Extraction of Lignin from Sugarcane Bagasse and Pinus taeda Wood chips Using Ethanol–Water Mixtures and Carbon Dioxide at High Pressures. Journal of Supercritical Fluids, v. 36, p. 31–39.

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

POLING, B.E.; PRAUSNITZ, J.M. & O'CONNELL, J.P. (2001) The properties of gases and liquids. 5 ed. ISBN: 0070116822. Estados Unidos. Mc Graw-Hill.

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

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION (2007) Annual World Ethanol Production by Country. http://www.ethanolrfa.org. Acesso: Ag./2007

RIOU, C. et al. (1998) Purification, Characterization and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-tolerant ß-glucosidase from Aspergillus oryzae. Applied and Enviromental Microbiology. v. 64, n. 10, p. 3607-3614.

RODRIGUES, M.I. & IEMMA, A.F. (2005) Planejamento de experimentos e otimização de Processos: Uma Estrategia seqüencial de planejamentos. Copyright © by Casa de Pão Editora. Campinas, São Paulo.

RUIZ, E.; CARA, C.; BALLESTEROS, M.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. & CASTRO, E. (2006) Ethanol Production from Pretreated Olive Tree Wood and Sunflower stalks by an SSF Process. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.129-132, p. 631-643.

SALOMÃO, A. & POLONI, G. (2007) Etanol: O Mundo Quer, O Brasil Tem. Revista Exame. Ed. 0870. Junho, p. 18-24.

SALOMÃO, A. & ONAGA, M. (2006) Combustível da Riqueza. Revista Exame. Ed. 0889. Março, p. 84-88.

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./2006.

SANTOS, A.S. (2000). 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.

SASSNER, P.; GALBE, M. & ZACCHI, G. (2006a) Techno-Economic Evaliation of Bioethanol Production from Three Different Lignocellulosic Materials. Lund University. 28th Symposum on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Nashville, Tennessee.

SASSNER, P.; GALBE, M. & ZACCHI, G. (2006b) Bioethanol Production Based on Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Salix at High Dry-Matter Content. Enzyme and Microbial Technology, v. 39, p. 756–762.

SCARAMUCCI, J.A. & CUNHA, M.P. (2005) O agronegócio da cana-de-açúcar como vetor de desenvolvimento. In: FÓRUM PERMANENTE DE ENERGIA & AMBIENTE. Campinas: UNICAMP. Disponível em: http://www.cori.unicamp.br. Acesso: dez./ 2005.

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

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

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

SEWALT, V.J.H.; BEAUCHEMIN K.A.; RODE L.M.; ACHARYA, S. & BARON, V.S. (1997) Lignin Impact on Fiber Degradation. IV. Enzymatic Saccharification and in vitro Digestibility of Alfalfa and Grasses Following Selective Solvent Deslignification. Bioresourse Technology, v, 61, p.199-206.

SHLESER, R. (1994) Ethanol Production in Hawaii: Processes, Feedstocks and Current Economic Feasibility of Fuel Grade Ethanol Production in Hawaii. Disponível em: www.hawaii.gov. Acessado: novembro/2005.

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. Bioresourse Technology, v.56. p. 134-140.

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/2006.

SREEKUMAR, O. CHAND, N. & BASAPPA, S. (1999) Optimization and Interaction of Nedia Components in Ethanol Production Using Zymomonas mobilis by Response Surface Methodology. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 88, n. 3, p. 334-338.

STENBERG, K.; BOLLÓK, M.; RÉCZEY, K.; GALBE, M. & ZACCHI, G. (1999) Effect of Substrate and Cellulase Concentration on SSF of Steam-Pretrated Softwood for Ethanol Production. Biotechnology and Bioengineering, v. 68, n. 2, p. 204-210.

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.

THORSELL, S.; EPPLIN, F.M.; RAYMOND L.; HUHNKE, R.L. & CHARLES M. TALIAFERRO, C.M. (2004) Economics of a Coordinated Biorefinery Feedstock Harvest System: Lignocellulosic Biomass Harvest Cost. Biomass and Bioenergy, v. 27, p. 327-337.

TIDEI, C. (2002) O futuro energético. Jornal da Unicamp. Disponível em: http://www.unicamp.br/unicamp. Acessado: junho/2007.

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

UNICAMP (2006) Pesquisa e Desenvolvimento em Etanol: Oxiteno apresenta projeto ao BNDES para construir biorrefinaria; quer obter etanol a baixo custo para fabricar produtos químicos. Inovaçaõ UNICAMP. Agosto 7 de 2006.

VARGA, E.; SZENGYEL Z. & RÉCZEY, K. (2002) Chemical Pretreatments of corn Strover for Enhancing Enzymatic Digestibility. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 98-100, p. 73-87.

VÁSQUEZ, M.P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA Jr., M.B. e PEREIRA Jr., N. (2005) Efecto de Diferentes Métodos de Deslignificación Sobre la Hidrólisis Enzimática de Celulignina. VIII SYNPOSIUM ON ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BIOMASS, Maringá, 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.

VLASENKO, E.Y.; DING, H., LABAVITCH, J.M. & SHOEMAKER, S.P. (1997) Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Rice Straw. Bioresourse Technology, v. 59, p. 109-119.

WINGREN, A.; GALBE, M. & ZACCHI, G. (2003) Techno-Economic Evaluation of Producing Ethanol from Softwood: Comparison of SSF and SHF and Identification of Bottlenecks. Biotechnology Progress, v. 19, p. 1109-1117.

WINGREN, A.; GALBE, M.; ROSLANDER, C.; RUDOLF, A. & ZACCHI, G. (2005) Effect of Reduction in Yeast and Enzyme Concentrations in a SSF

Based Bioethanol Process. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 121-124, p. 485-499.

YUNG, R.A. & ROWELL, R.M. (1986) Cellulose Structure. Modification and Hydrolysis. University of Wisconsin, Madison, Wisconsin.

XIAOBO, Z.; HAIYING, W.; LINYU, H.; YONGCHENG, L. & ZHONGTAO, L. (2006) Medium Optimization of Carbon and Nitrogen Sources for the Production of Eucalyptene A and Xyloketal A from *Xylaria* sp. 2508 Using Response Surface Methodology. Process Biochemistry, v. 41, p. 293–298.

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.