



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



## **PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

**Héricles Resende Ricardo de Aguiar**  
**Orientador: Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro**

**Uberlândia – MG**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



## **PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

**Hérciles Resende Ricardo de Aguiar**

**Orientador: Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro**

**Monografia de graduação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para a aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso do curso de Engenharia Química.**

**Uberlândia – MG**

**2017**

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA MONOGRAFIA DA DISCIPLINA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE HÉRICLES RESENDE RICARDO DE  
AGUIAR APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, EM 30  
DE NOVEMBRO DE 2017.

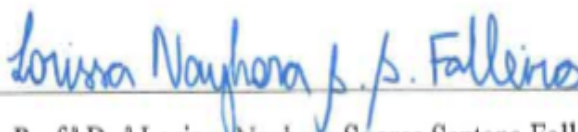
BANCA EXAMINADORA



---

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro

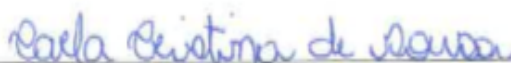
(Orientador - FEQ/UFU)



---

Prof.ª Dr.ª Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros

(FEQ/UFU)



---

Discente de Mestrado Carla Cristina de Sousa

(FEQ/UFU)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a toda minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre estar presente em minha vida e na de minha família, por me conceder oportunidades únicas e por mostrar a sua grandeza diariamente.

A minha família, pela educação e princípios que me foram fornecidos, por todo amor, compreensão e apoio, pelo constante incentivo aos estudos e por ser a minha grande motivação para alcançar os meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eloízio, pela orientação e apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho, por toda experiência e ensinamentos compartilhados.

Aos meus amigos, que contribuíram de forma direta ou indireta com a realização deste trabalho. Aos amigos de longa data, por acreditarem no meu potencial e por sempre me incentivarem, mesmo distantes fisicamente. Aos novos amigos, pelo apoio, carinho e companheirismo, por tornarem cada dia da minha graduação mais alegre.

"Erros são, no final das contas, fundamentos da verdade. Se um homem não sabe o que uma coisa é, já é um avanço do conhecimento saber o que ela não é."

Carl Jung

## SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	i
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
<b>1 - FUNDAMENTOS</b> .....	<b>1</b>
1.1 - Contexto energético atual.....	1
1.2 - Biocombustíveis.....	5
1.3 - Etanol .....	6
1.3.1 - Etanol de primeira geração .....	7
1.3.2 - Etanol de segunda geração.....	9
1.4 - Objetivo geral .....	15
1.5 - Objetivos específicos .....	15
<b>2 - MATÉRIAS-PRIMAS EMPREGADAS</b> .....	<b>16</b>
2.1 - Materiais lignocelulósicos .....	16
2.1.1 - Celulose .....	19
2.1.2 - Hemiceluloses .....	20
2.1.3 - Lignina.....	22
<b>3 - PRINCIPAIS MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO</b> .....	<b>25</b>
3.1 - Pré-tratamentos físicos .....	30
3.1.1 - Explosão a vapor.....	31
3.1.2 - Termo-hidrólise.....	33
3.2 - Pré-tratamentos químicos .....	33
3.2.1 - Pré-tratamento ácido.....	33
3.2.2 - Pré-tratamento alcalino.....	34
3.2.3 - Organosolv.....	34
3.3 - Pré-tratamentos biológicos .....	35
3.4 - Pré-tratamentos combinados.....	36
3.4.1 - Afex (ammonia fiber explosion) .....	36
3.4.2 - Explosão a vapor catalisada.....	36
<b>4 - HIDRÓLISE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS</b> .....	<b>38</b>
4.1 - Hidrólise ácida .....	39
4.1.1 - Produção de compostos inibitórios .....	41

4.2 - Hidrólise enzimática.....	44
4.2.1 - Celulases.....	46
4.2.2 - Hemicelulases.....	48
4.2.3 - Inibição enzimática.....	50
4.3 - Comparação entre a hidrólise ácida e a enzimática.....	51
<b>5 - FERMENTAÇÃO DO MATERIAL HIDROLISADO.....</b>	<b>53</b>
5.1 - Aspectos gerais da fermentação alcoólica.....	53
5.2 - Microrganismos produtores de etanol.....	54
5.2.1 - Microrganismos produtores de etanol a partir de pentoses.....	55
5.3 - Processos de fermentação.....	57
5.3.1 - Hidrólise e Fermentação Separadas (SHF).....	58
5.3.2 - Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF).....	60
5.3.3 - Sacarificação e Co-fermentação Simultâneas (SSCF).....	62
5.3.4 - Bioprocesso Consolidado (CPB).....	63
<b>6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>65</b>
REFERÊNCIAS.....	67



## Lista de Figuras

Figura 1.1 - Oferta interna de energia no Brasil, ano base 2014 (BRASIL, 2015a).....	2
Figura 1.2 - Produção mundial de óleo vegetal hidrotratado, biodiesel e etanol - 2000 a 2013 (REN21, 2014).....	2
Figura 1.3 - Composição da cana-de-açúcar em termos de suco, bagaço e palha (UNICA apud RIBEIRO, 2013).....	4
Figura 1.4 - Diagrama dos potenciais energéticos da cana-de-açúcar (International Sugar Journal/DEDINI apud NOVACANA, 2017a).....	5
Figura 1.5 - Redução das emissões de veículos novos no Brasil (Elaborado com base em IBAMA, 2006 apud BNDES; CGEE, 2008).....	7
Figura 1.6 - Processo simplificado da produção de etanol de primeira geração e de açúcar, considerando-se o uso do bagaço para cogeração de energia (ZANARDI; COSTA JUNIOR, 2016).....	9
Figura 1.7 - Geração de eletricidade por fonte no Brasil (GWh) (CARPIO; SOUZA, 2017).....	11
Figura 1.8 - Processo simplificado da produção de etanol de segunda geração (NUNES et al., 2013).....	12
Figura 1.9 - Comparação entre diferentes rotas tecnológicas de produção de bioetanol (BNDES; CGEE, 2008).....	13
Figura 2.1 - Visão geral da parede celular vegetal (MURPHY; MCCARTHY, 2005 apud BERNARDO NETO, 2009).....	18
Figura 2.2 - Polímero de celulose com as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (JARDINE et al., 2009).....	19
Figura 2.3 - Regiões cristalinas e amorfas na estrutura da celulose (KLOCK, 2013).....	20
Figura 2.4 - Monossacarídeos constituintes da hemicelulose. (1) D-glicose, (2) D-galactose, (3) L-arabinose, (4) D-xilose, (5) D-manose, (6) 4-O-metil-D-glucurônico, (7) L-ramnose (SJÖSTRÖM; WESTERNARK, 1999 apud PITARELO, 2013).....	21
Figura 2.5 - Estrutura molecular de uma hemicelulose (ROSA; GARCIA, 2009).....	21
Figura 2.6 - Principais precursores da lignina (MARTINS, 2005).....	22
Figura 2.7 - Representação da estrutura da lignina (ROSA; GARCIA, 2009 apud DRABER, 2013).....	23

Figura 3.1 - Efeito do pré-tratamento na estrutura da lignocelulose (SANTOS et al., 2012).....	25
Figura 3.2 - Micrografias Eletrônicas de Varredura (MEV) para folhas de palmeira sem pré-tratamento (A) e submetidas a diferentes tipos de pré-tratamento, termo-hidrólise (B), ácido (C) e alcalino (D) (HONG et al., 2008 apud SUAREZ, 2014).....	27
Figura 3.3 - Hidrólise de 4-O-metil-glucuranoxilana e celulose. (1) Arabinose, (2) xilose, (3) xilo-oligômeros acetilados, (4) xilo-oligômeros de grande massa molecular, (5) oligossacarídeos, (6) glicose, (7) celobiose, (8) celo-oligômeros, (9) furfural, (10) hidroximetilfurfural, (11) ácido levulínico, (12) furano, (13) ácido furóico. Ácido fórmico e ácido acético também são formados (RAMOS, 2003).....	32
Figura 3.4 - Representação do processo DHR (SOARES; OLIVÉRIO, 2008).....	35
Figura 4.1 - Diagrama da hidrólise ácida (BUCKERIDGE et al., 2010).....	38
Figura 4.2 - Hidrólise ácida diluída (primeiro e segundo estágios) e fermentação separada de açúcares pentose e hexose (CHANDEL et al., 2007 apud BALAT et al., 2008).....	40
Figura 4.3 - Formação de compostos inibitórios da hidrólise e fermentação (Adaptado de PALMQVIST et al., 1999 apud SILVA, 2015).....	41
Figura 4.4 - Representação esquemática da maioria das enzimas celulases (BANSAL et al., 2009 apud CARVALHO, 2011).....	46
Figura 4.5 - Hidrólise da celulose pela ação das celulases (LYND et al., 2002 apud SUAREZ, 2014).....	47
Figura 4.6 - Pontos de ação das enzimas hidrolíticas que atuam na hidrólise da hemicelulose (KUMAR, 2008 apud MENDES, 2010).....	48
Figura 4.7 - Alguns fatores limitantes da hidrólise enzimática (JØRGENSEN et al., 2007 apud WOLF, 2011).....	49
Figura 5.1 - Comparação das quatro diferentes estratégias de produção de etanol de segunda geração (GUILHERME, 2014).....	57
Figura 5.2 - Representação esquemática do processo de Hidrólise e Fermentação Separadas (SHF) (PEREIRA JR. et al., apud WINGREEN, 2008 apud SANTOS, 2012) .....	58
Figura 5.3 - Representação esquemática do processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF) (PEREIRA JR. et al., apud WINGREEN, 2008 apud SANTOS, 2012).....	61

Figura 5.4 - Representação esquemática do processo de Sacarificação e Co-fermentação Simultâneas (SSCF) (PEREIRA JR. et al., apud WINGREEN, 2008 apud SANTOS, 2012).....	61
Figura 5.5 - Representação esquemática da configuração Bioprocesso Consolidado (CPB) (PEREIRA JR. et al., apud WINGREEN, 2008 apud SANTOS, 2012).....	62
Figura 5.6 - Fluxograma representativo do processo no qual todas as etapas críticas da produção de etanol 2G são realizadas simultaneamente (VÁSQUEZ, 2007).....	63

## RESUMO

Em relação à sustentabilidade, desafios cada vez maiores são enfrentados pela sociedade atual e devido à escassez das reservas de petróleo e às mudanças climáticas, as fontes de energia renováveis têm-se apresentado como uma alternativa ao futuro do planeta. Dentre as fontes de energia renováveis, pode-se mencionar os biocombustíveis, que têm sido bastante utilizados. No caso do Brasil, o mais proeminente é o etanol, visto que o país é reconhecido mundialmente pela produção desse combustível. Entretanto, a produção de açúcar e de etanol de primeira geração usa aproximadamente apenas um terço da energia total da cana-de-açúcar, pois aproximadamente dois terços estão na palha e bagaço, fato que tem despertado o interesse do setor sucroenergético em usar tais biomassas na produção de etanol de segunda geração. Uma vez consolidada a obtenção de etanol 2G no Brasil, esta terá potencial para aumentar a produtividade em até 50% em relação à produção atual. Porém, alguns fatores ainda representam desafios a serem superados, para que a produção de etanol de segunda geração seja implementada comercialmente e ganhe participação no mercado. Pode-se citar, por exemplo, a existência de outras aplicações para os resíduos lignocelulósicos e o fato de que o processo produtivo exige algumas etapas que não estão presentes na produção do etanol 1G (pré-tratamento e hidrólise da matéria-prima) e que necessitam do domínio de tecnologias ainda não completamente desenvolvidas e que atualmente são complexas, o que resulta em baixo rendimento na conversão da matéria-prima, balanço energético negativo e custo de produção elevado. Considerando o uso de cana-de-açúcar, a diferença entre o custo de produção do etanol 2G e do 1G pode alcançar R\$ 0,30 por litro. Dessa forma, com o intuito de romper as barreiras existentes à produção do etanol de segunda geração, pesquisas têm sido realizadas, visando tanto o desenvolvimento de tecnologias de produção quanto a melhoria da matéria-prima utilizada. Por esses e outros fatores, o objetivo geral desse trabalho é realizar uma revisão bibliográfica sobre o processo produtivo do etanol de segunda geração. Os objetivos específicos são: apresentar as matérias-primas usadas, descrever os principais métodos de pré-tratamento em uso, discorrer sobre a etapa de hidrólise e descrever a fermentação do hidrolisado.

Palavras-chave: Etanol de segunda geração, lignocelulose, bagaço de cana-de-açúcar.

## ABSTRACT

In relation to sustainability, increasing challenges are faced by actual society and due to the scarcity of the oil reserves and climate changes, the renewable energy sources have presented themselves as an alternative to the future of the planet. Among the renewable energy sources, it can mention biofuels, which have been quite used. In the case of Brazil, the most prominent is ethanol, since the country is worldwide acknowledged for the production of this fuel. However, the sugar production and of first generation ethanol uses only about one-third of the total energy of the sugarcane, because approximately two-thirds are in the straw and bagasse, fact that has aroused the interest of the sugar and energy sector in using such biomass in the second generation ethanol production. Once the 2G ethanol obtention is consolidated in Brazil, it will have potential to increase the productivity in up to 50% in relation to the current production. However, some factors still represent challenges to be overcome, so the second generation ethanol production is commercially implemented and gains market share. It can cite, for example, the existence of other applications for the lignocellulosic waste and the fact that the productive process requires some steps that are not present in the 1G ethanol production (pretreatment and hydrolysis of the raw material) and which need the domain of technologies that are not yet completely developed and which are currently complex, which results in low yield in the conversion of the raw material, negative energy balance and high production cost. Considering the use of sugarcane, the difference between the production cost of the 2G and 1G ethanol can reach R\$ 0.30 per liter. Thus, in order to break the existing barriers to the second generation ethanol production, researches have been carried out, aiming at both the development of production technologies and the improvement of the raw material used. For these and other factors, the general objective of this work is to make a bibliographic review about the second generation ethanol productive process. The specific objectives are: to present the raw materials used, to describe the main pretreatment methods in use, to talk about the hydrolysis step and to describe the fermentation of the hydrolyzate.

Keywords: Second generation ethanol, lignocellulose, sugarcane bagasse.

# CAPÍTULO 1

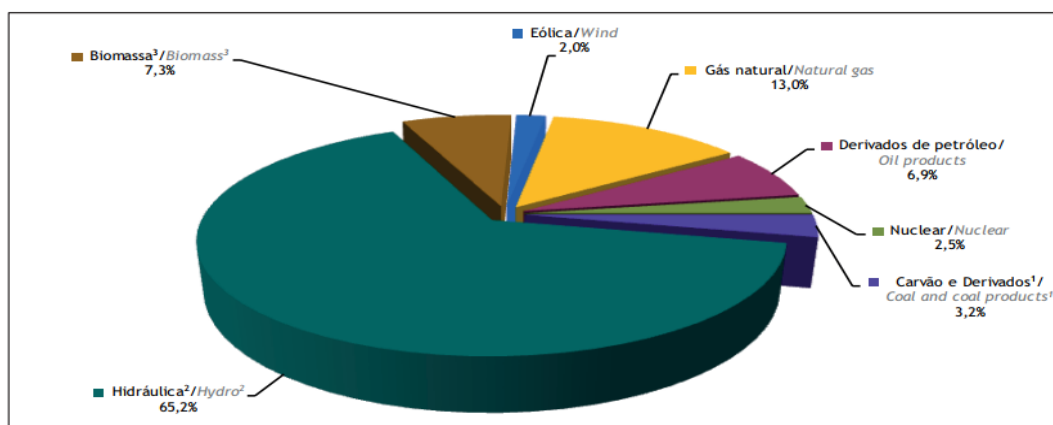
## FUNDAMENTOS

### 1.1 - Contexto energético atual

A atual sociedade tecnológica possui desafios cada vez maiores no que diz respeito à sua sustentabilidade. Um dos setores que mais têm buscado soluções para tal problema é o de geração de energia, isto porque a demanda energética tem aumentado ano após ano. Para ter-se ideia da situação, apenas no Brasil, de acordo com o Balanço Energético Nacional publicado em 2014 pela Empresa de Pesquisa Energética, o consumo total de energia (não refere-se apenas à energia elétrica, mas sim a todas as formas de energia utilizadas, independentemente da finalidade) passou de 215.498 tep (toneladas equivalentes de petróleo) em 2004 para 282.560 tep no ano de 2013, o que representa um incremento de mais de 30% em pouco menos de dez anos (DUPONT et al., 2015).

Desta forma, levando-se em consideração a escassez das reservas de petróleo e as mudanças climáticas, as fontes renováveis de energia têm-se apresentado como importantes alternativas ao futuro do planeta (DRABER, 2013). Tal fato tem contribuído para que seu uso receba cada vez mais incentivos, sendo destaque em políticas públicas, que fundamentam-se na redução da dependência de combustíveis fósseis e na diminuição da emissão de gases do efeito estufa (SOUZA, 2010).

É possível perceber o significativo avanço das fontes renováveis de energia quando analisa-se a Figura 1.1, que mostra como a oferta interna de energia no Brasil encontrava-se distribuída no balanço energético do ano de 2015, ano base 2014. Observa-se que 74,5% da energia interna ofertada eram renováveis, assim como a contribuição da biomassa foi maior do que a dos próprios derivados de petróleo, 7,3% frente a 6,9%, respectivamente.



Notas/ Notes:

<sup>1</sup> Inclui gás de coqueria/ Includes coke oven gas

<sup>2</sup> Inclui importação de eletricidade/ Includes electricity imports

<sup>3</sup> Inclui lenha, bagaço de cana, lixívia e outras recuperações/ Includes firewood, sugarcane bagasse, black-liquor and other primary sources

Figura 1.1 - Oferta interna de energia no Brasil, ano base 2014 (BRASIL, 2015a).

Dentre as fontes renováveis de energia, pode-se citar os biocombustíveis, que têm sido bastante utilizados atualmente.

A Figura 1.2, por exemplo, apresenta o avanço na produção mundial de alguns biocombustíveis, mais especificamente, óleo vegetal hidrotratado, biodiesel e etanol, desde o ano de 2000 até 2013.

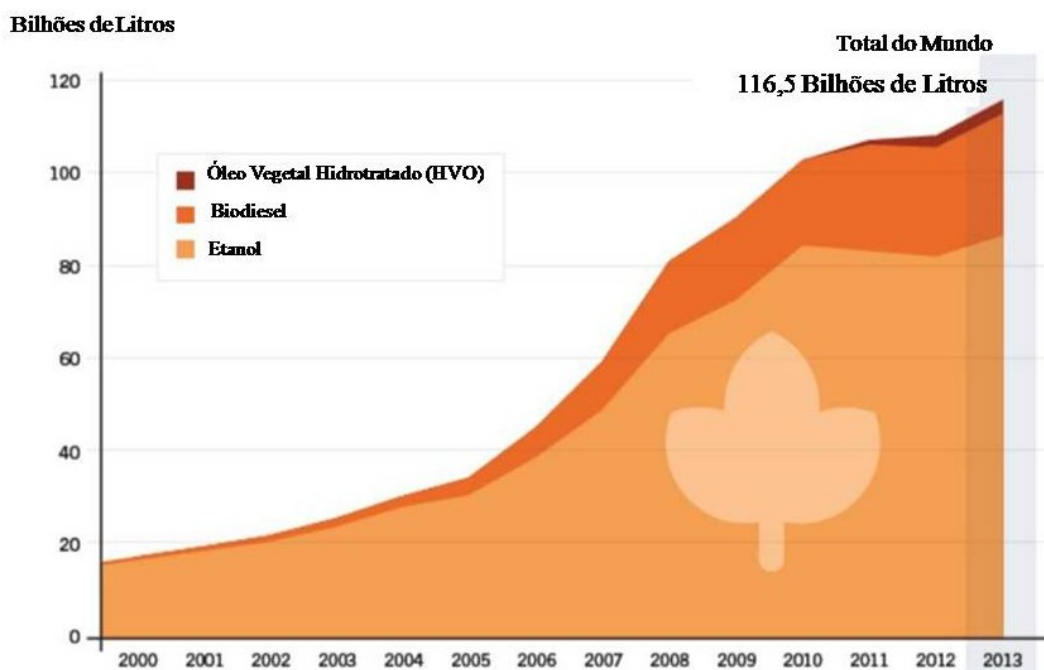


Figura 1.2 - Produção mundial de óleo vegetal hidrotratado, biodiesel e etanol - 2000 a 2013 (REN21, 2014).

Observando-se os dados apresentados acima, percebe-se que ao longo dos anos houve um aumento significativo na produção dos biocombustíveis analisados. Para ter-se uma noção melhor, apenas do final de 2012 para o final de 2013, a produção de biodiesel aumentou de 23,6 bilhões de litros para 26,3 bilhões de litros e a de etanol, de 82,6 bilhões de litros para 87,2 bilhões de litros (REN21, 2014). Tal tendência reflete o fato de que o uso de fontes renováveis de energia tem-se tornado cada vez mais frequente.

Devido às suas características, o biodiesel mostra-se como uma fonte renovável de energia viável na substituição do diesel de petróleo. Entretanto, no Brasil, o biocombustível com maior destaque é o etanol, que tem como principal vantagem em relação aos combustíveis derivados do petróleo a menor poluição gerada pela sua combustão (RAMOS, 2003 apud ULHOA, 2013).

De acordo com CARVALHO et al. (2013), os primeiros estudos com álcool combustível no Brasil ocorreram no início da década de 1920, o que contribuiu para que o setor de cana-de-açúcar ficasse mais estável, pois neste período o açúcar perdia espaço no mercado externo. Em 1931, o governo federal decretou a lei nº 19.717, tornando-se obrigatória a adição de álcool à gasolina importada (com uma proporção inicial de 5%), o que tinha como intuito regularizar a situação do setor açucareiro que encontrava-se em uma grande crise, o que acabou culminando também na criação, em 1933 pelo governo de Getúlio Vargas, do Instituto do Açúcar e Álcool (IAA).

Em 14 de novembro de 1975 foi criado o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), que teve como objetivos contribuir com o desenvolvimento das técnicas e melhoria das matérias-primas utilizadas no processo de produção de álcool etílico. Na primeira etapa, de 1975 a 1979, o foco do Proálcool foi a obtenção de álcool etílico anidro para ser adicionado à gasolina (ANDRADE et al., 2009). Na etapa seguinte, a atenção voltou-se para o etanol hidratado, usado puro nos motores (LEME, 2004 apud CARVALHO et al., 2013).

Atualmente, o Brasil é reconhecido tanto na produção de cana-de-açúcar, quanto na produção de açúcar e etanol. Com relação à produção de cana-de-açúcar e de açúcar, é o maior produtor do mundo. Na safra de 2016/2017 obteve 657,18 milhões de toneladas de cana e 38,69 milhões de toneladas de açúcar. No caso do etanol, o país é o segundo maior produtor (o primeiro lugar é ocupado pelos Estados Unidos). Na safra de 2016/2017, atingiu uma produção de 27,8 bilhões de litros, sendo 11,07 bilhões de litros de etanol anidro e 16,73 bilhões de litros de etanol hidratado (CONAB, 2017; UNICA, 2015).

Entretanto, a produção de açúcar e de etanol de primeira geração, também conhecido como etanol 1G, usa aproximadamente apenas um terço da energia total disponível na cana-



de-açúcar, obtida por meio de seu caldo. Esta informação indica, portanto, que em torno de dois terços da energia da planta encontra-se nas suas palhas e bagaço. Como geralmente apenas 70% do bagaço gerado no processamento da cana são queimados nas caldeiras das usinas para geração de energia, isto origina um excedente deste resíduo, fato que tem despertado o interesse do setor sucroenergético em utilizar o bagaço restante na produção de etanol de segunda geração, também chamado de etanol 2G, agregando tecnologias sustentáveis ao seu processo produtivo (BASTOS, 2007; CANILHA, 2010; CONAB, 2011 apud ARAÚJO et al., 2013).

A proporção entre suco, bagaço e palha na composição e distribuição de energia da cana-de-açúcar, assim como o destino dado a cada um destes materiais, encontra-se representada de forma esquemática na Figura 1.3, elaborada pela União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA).

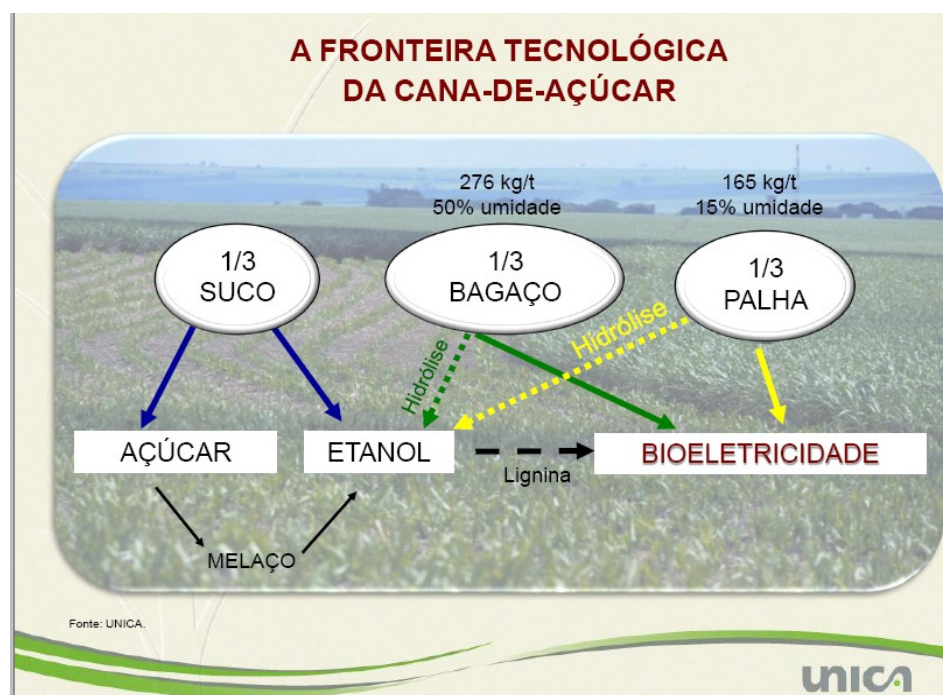


Figura 1.3 - Composição da cana-de-açúcar em termos de suco, bagaço e palha (UNICA apud RIBEIRO, 2013).

A Figura 1.4, por sua vez, trata-se de um diagrama, elaborado pelo novaCana, que mostra como a quantidade de energia, inicialmente presente na cana limpa, distribui-se entre seus componentes, açúcar, bagaço e palha.

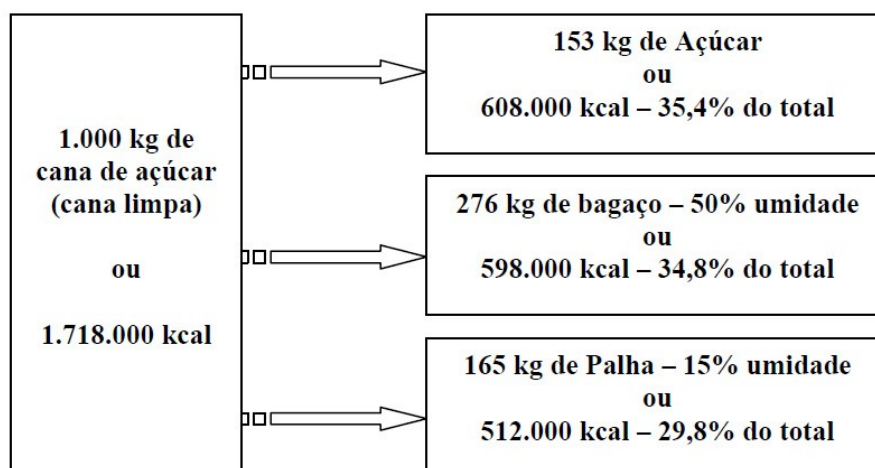


Figura 1.4 - Diagrama dos potenciais energéticos da cana-de-açúcar (International Sugar Journal/DEDINI apud NOVACANA, 2017a).

Observando-se o diagrama, é possível notar que o bagaço e a palha da cana representam uma fonte energética com grande potencial de uso, totalizando, para cada tonelada de cana limpa, 1.110.000 kcal disponíveis. Desta forma, a produção de etanol de segunda geração apresenta-se como uma forma de aumentar a disponibilidade de energia por meio do uso de fontes renováveis, sem a necessidade de expandir a área agricultável, pois representa uma alternativa para o uso energético da biomassa.

## 1.2 - Biocombustíveis

Os biocombustíveis são definidos como combustíveis produzidos a partir de biomassa (matéria orgânica), de origem vegetal ou animal, e que são biodegradáveis. As principais fontes de produção são: cana-de-açúcar, milho, soja, semente de girassol, madeira e celulose (BRASIL, 2007).

Tais combustíveis podem ser produzidos tanto na forma líquida quanto gasosa e são empregados principalmente na área de transportes. Na forma líquida incluem, por exemplo, o metanol, etanol, butanol e o biodiesel, podendo ser utilizados em veículos, locomotivas, motores elétricos, turbinas ou células a combustível. Já na forma gasosa, compreendem os gases hidrogênio e metano (DEMIRBAS, 2008).

Os biocombustíveis têm representado um grande e crescente interesse, pois seu uso reduz a emissão de gases que contribuem com o efeito estufa e, conseqüentemente, diminui o aquecimento global. Além disso, esta fonte de energia pode representar uma alternativa ao uso do petróleo (ROSA; GARCIA, 2009). Outra vantagem ambiental é a possível redução das

emissões de gases e partículas que causam prejuízos à saúde humana e ao meio ambiente, como por exemplo, monóxido de carbono, hidrocarbonetos e óxidos de enxofre e nitrogênio (URQUIAGA et al., 2005).

Já uma desvantagem dos biocombustíveis é que a sua produção enfrenta uma limitação fundamental: baseia-se em plantas que exigem extensas áreas de cultivo. Dessa forma, podem surgir conflitos de terra para produção de biocombustíveis ou alimentos (ROSA; GARCIA, 2009).

No que diz respeito à realidade Brasileira, GOLDEMBERG et al. (2008b), por sua vez, afirmaram que o uso de novas áreas pela agricultura voltada para a produção de energia tem ocorrido sem competição com a agricultura de alimentos. Além disso, relataram que há uma grande disponibilidade de terras com pastagens degradadas, podendo ser utilizadas no cultivo de cana-de-açúcar, o que ainda irá beneficiar o pecuarista, que pode ter um aumento na rentabilidade de sua propriedade, assim como melhorar a condição de fertilidade do solo.

Outro ponto muito discutido é que os diversos artigos na imprensa e trabalhos científicos publicados não abordam a quantidade de combustíveis fósseis usados na produção dos biocombustíveis e é exatamente esta relação entre a energia contida no biocombustível produzido e a energia fóssil empregada no seu processo de produção (agrícola e industrial) que fornece o balanço energético do combustível (URQUIAGA et al., 2005).

### **1.3 - Etanol**

O etanol é caracterizado como um combustível, que pode ser obtido tanto por meio de processos petroquímicos e carboquímicos quanto pelo uso de biomassa. Entretanto, o etanol possui algumas características que o diferenciam dos combustíveis convencionais que são derivados do petróleo. Neste sentido, pode-se citar o significativo teor de oxigênio, que constitui aproximadamente 35% em massa do etanol, e sua combustão mais limpa, mesmo quando em mistura com a gasolina (BNDES; CGEE, 2008).

Seu uso como combustível pode ocorrer na forma hidratada, para carros movidos exclusivamente a álcool ou para os classificados como *flex fuel*, e na forma anidra, na qual é adicionado à gasolina em uma proporção máxima de 27% (BRASIL, 2007, 2015b).

Também chamado de álcool etílico, é um composto orgânico, oxigenado e de fórmula química  $C_2H_5OH$ . A obtenção de bioetanol ocorre por meio da fermentação de produtos agrícolas (ANDREOLI; SOUZA, 2006 apud SOUZA, 2010; GOLDEMBERG et al., 2008a).

A Figura 1.5 deixa clara a vantagem ambiental do uso do etanol como combustível veicular frente a outros combustíveis, pois ela mostra exatamente como a emissão de gases considerados poluentes atmosféricos reduziu com a implementação do etanol no mercado de combustíveis ao longo dos anos, desde 1980 até 2000.

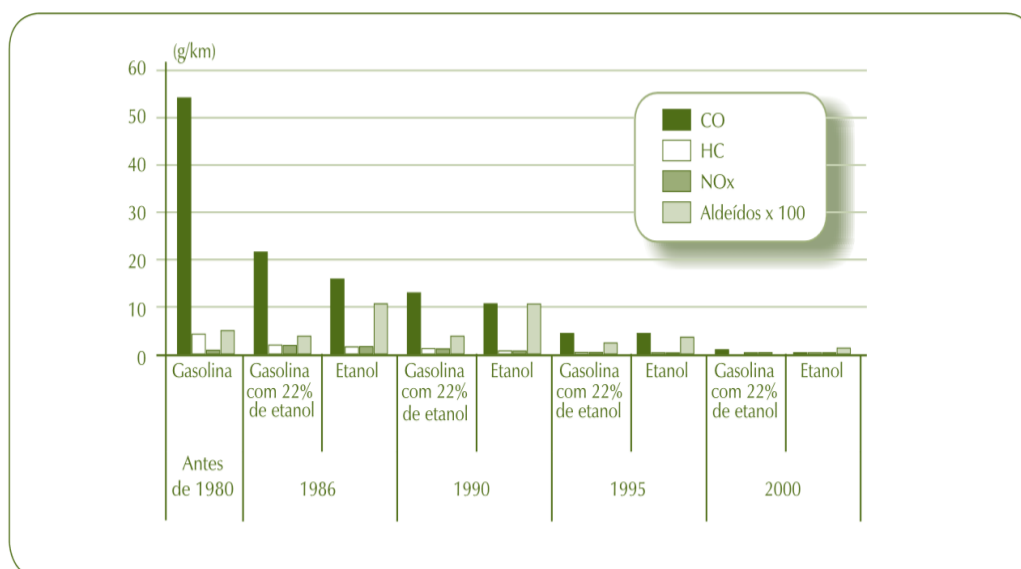


Figura 1.5 - Redução das emissões de veículos novos no Brasil (Elaborado com base em IBAMA, 2006 apud BNDES; CGEE, 2008).

Entretanto, vale ressaltar que o desenvolvimento tecnológico dos motores também contribuiu com a redução da emissão dos poluentes pelos veículos (BNDES; CGEE, 2008).

### 1.3.1 - Etanol de primeira geração

Combustíveis de primeira geração incluem biodiesel e etanol e são produzidos a partir do processamento de amido, óleo vegetal, gordura animal ou açúcar. No caso do etanol de primeira geração, sua produção baseia-se no uso de cana-de-açúcar, beterraba, trigo, mandioca e milho (CARVALHO et al., 2013).

No Brasil, o etanol ainda é obtido majoritariamente por meio da fermentação do açúcar contido na cana, extraído pelo uso de moendas. Porém, destilarias que fermentam apenas o caldo de cana têm-se tornado minoria. Denominadas de destilarias autônomas, estas têm sido transferidas para usinas de açúcar, passando a fermentar tanto o caldo quanto o melaço, subproduto de uma das etapas de fabricação de açúcar, a cristalização da sacarose. A vantagem que há no uso do melaço na fermentação é que além dele conter aproximadamente

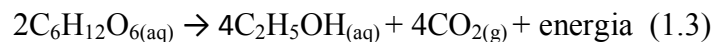
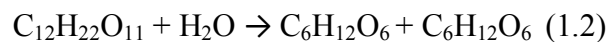
90% de BRIX, dos quais 60% são açúcares redutores, ainda possui elementos necessários para que a fermentação ocorra sem a adição de nutrientes (ANDRIETTA et al., 2006).

A seleção da cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção do etanol possui dois motivos principais: o rendimento energético, que é considerado satisfatório, e a própria realidade brasileira, pois como visto, o Brasil é um dos líderes de mercado e tecnologia dessa cultura (BERNARDO NETO, 2009).

O processo de fermentação pode ser representado pela Equação 1.1, que descreve a reação química global entre sacarose e água, a qual origina etanol e dióxido de carbono:



As reações independentes, que resultam na reação global anterior, estão representadas pelas Equações 1.2 e 1.3. Na primeira reação a sacarose é hidrolisada em glicose e frutose. Estas, por sua vez, como são açúcares fermentescíveis, originam o etanol após a fermentação, representada pela segunda reação.



De forma simplificada, a Figura 1.6 apresenta as principais etapas envolvidas na produção do etanol 1G e de açúcar a partir da cana-de-açúcar.

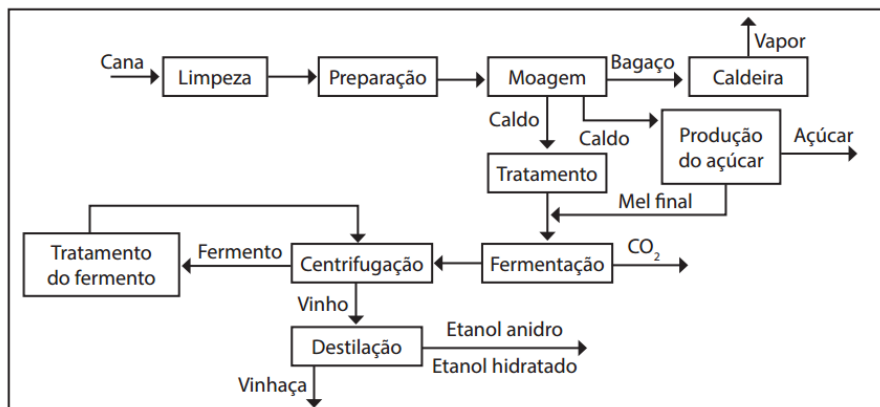


Figura 1.6 - Processo simplificado da produção de etanol de primeira geração e de açúcar, considerando-se o uso do bagaço para cogeração de energia (ZANARDI; COSTA JUNIOR, 2016).

Conforme já mencionado, o rendimento energético da produção de açúcar e de etanol 1G é de aproximadamente apenas 30% do total de energia presente na planta, o que tem como justificativa o fato de que somente a sacarose é aproveitada como insumo para esse fim, sendo o bagaço e a palha da cana usados em outras atividades, por exemplo, cogeração de energia (BERNARDO NETO, 2009).

### **1.3.2 - Etanol de segunda geração**

O etanol de segunda geração tem como matéria-prima a lignocelulose, componente que encontra-se presente na constituição de resíduos de origem vegetal. Desta forma, vantagens ambientais e econômicas surgem ao se investir neste novo biocombustível, tornando a sua produção bastante atraente (CARVALHO et al., 2013). Um exemplo dessas vantagens compõe o caso do Brasil, em que a produção de etanol de segunda geração representa a possibilidade de aumentar a produção de etanol sem expandir a área plantada em cana-de-açúcar, por meio do uso do bagaço e palha da cana (JARDINE et al., 2009).

De acordo com MILANEZ et al. (2015), a obtenção de etanol de segunda geração no Brasil, uma vez concretizada, possui potencial para aumentar a produtividade em até 50% com relação à produção atual. Tal resultado é possível em razão da capacidade energética de materiais lignocelulósicos, que teoricamente permitem produzir, para cada 10 milhões de toneladas de biomassa seca, 600 milhões de galões de etanol, o que significa aproximadamente 227,12 L/tonelada, e isto considerando apenas a fração celulósica do material (PEREIRA JR. et al., 2008 apud SANTOS, 2012). Mais especificamente para o bagaço de cana seco, o rendimento varia entre 158 L/tonelada e 335 L/tonelada (CARPIO; SOUZA, 2017). Em termos de comparação, o rendimento da cana-de-açúcar para a produção de etanol de primeira geração é de aproximadamente 90 L/tonelada, do milho de 460 L/tonelada e da beterraba, de 100 L/tonelada (BNDES; CGEE, 2008; MACHADO; ABREU, 2006 apud MANOCHIO, 2014).

Porém, alguns fatores ainda representam desafios a serem vencidos, para que a produção de etanol de segunda geração seja implementada de forma comercial e ganhe espaço no mercado.

Por exemplo, no que diz respeito à produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa advinda do setor sucroenergético, tanto o bagaço excedente das usinas quanto a palha da cana-de-açúcar possuem nos dias atuais outras aplicações muito rentáveis.

No caso da palha, como já existe a possibilidade de seu recolhimento por meio da execução da colheita mecanizada, sendo possível retirar em torno de 50% do material presente na área de plantio, esta tem sido utilizada para a cogeração de energia juntamente com o bagaço, aumentando o potencial energético do setor de açúcar e energia (NOVACANA, 2016a; SILVA et al., 2016).

Também tem-se como aplicação para os resíduos da produção de açúcar e etanol de primeira geração a obtenção de pellets de biomassa. Hoje, os pellets de biomassa de madeira dominam a indústria, mas a aposta de empresas do setor sucroenergético é que ocorra um salto global no consumo deste produto (de 25 milhões de toneladas para 40 milhões) nos próximos cinco anos. Como o Brasil é o maior produtor de cana, possui a capacidade de fabricação de, aproximadamente, 80 milhões de toneladas de pellets feitos de bagaço, suficientes para atender toda a demanda (NOVACANA, 2016a).

No que tange a cogeração de energia, é possível ter maior noção da capacidade energética desses resíduos da cana-de-açúcar analisando-se alguns dados obtidos pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). As pesquisas mostraram que para cada tonelada de colmo de cana, obtém-se, em base seca, 140 kg de bagaço e 140 kg de palha. Como essas biomassas possuem um poder calorífico muito próximo, nas condições de operação das caldeiras usadas no setor, alcançou-se uma produção de 0,4 MWh por tonelada de bagaço (50% de umidade) e 0,7 MWh por tonelada de palha (15% de umidade). Dessa forma, seria possível obter 27,5 TWh de energia elétrica por ano usando-se o bagaço e 50% da palha da cana, o que equivale a duas vezes e meia a geração média da Usina de Belo Monte (11,2 TWh) (SILVA et al., 2016).

Em razão desse potencial, o uso do bagaço e da palha de cana na geração de energia elétrica tem representado uma oportunidade estratégica para o sistema energético brasileiro, principalmente durante os períodos em que os reservatórios de água das hidrelétricas apresentam-se com seus níveis mais baixos, permitindo que a energia elétrica produzida seja complementada com a bioeletricidade (CARPIO; SOUZA, 2017). Tal cenário fica claro observando-se a Figura 1.7, na qual é possível notar o crescimento contínuo da bioeletricidade como fonte de eletricidade.

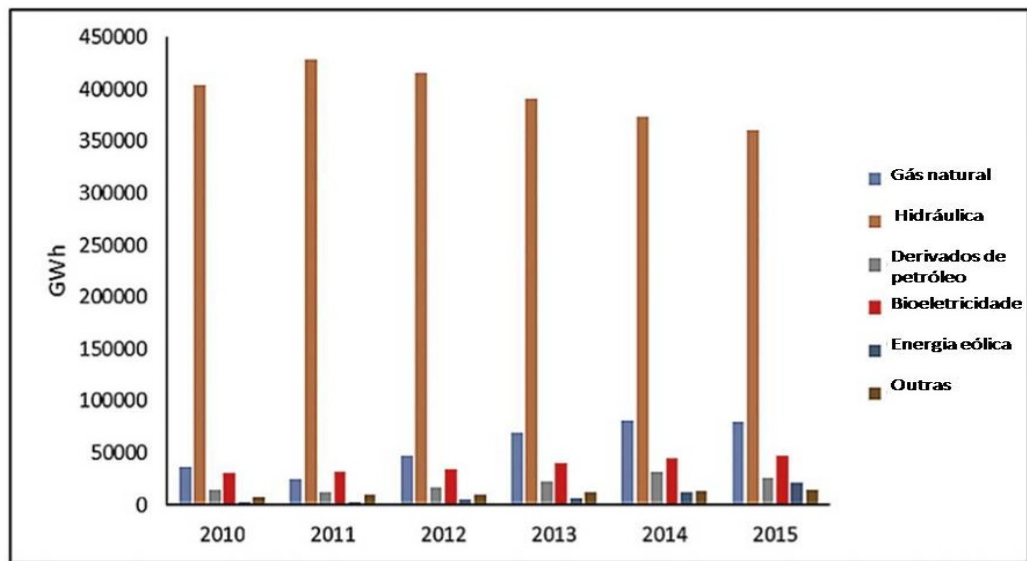


Figura 1.7 - Geração de eletricidade por fonte no Brasil (GWh) (CARPIO; SOUZA, 2017).

Contudo, mesmo com todas as vantagens para as usinas em focarem no uso da biomassa remanescente dos seus processos produtivos para a cogeração de energia ao invés da produção de etanol de segunda geração, a ANEEL exige que as centrais geradoras de energia elétrica que utilizam bagaço de cana-de-açúcar como fonte de combustível tenham um potencial máximo, que é de 2.420 MW (MARIANI FILHO, 2006).

Assim, por causa do uso de processos cada vez mais eficientes, o setor sucroenergético tem-se tornado um grande gerador de excedentes de energia elétrica, o que viabiliza ainda mais o uso do material lignocelulósico restante na produção de açúcares fermentescíveis (rota química e biológica) ou na gaseificação deste material e posterior síntese de combustíveis líquidos (rota térmica) (RABELO, 2010).

Outro fator limitante do avanço do etanol de segunda geração é que, independentemente da sua fonte de matéria-prima, seja bagaço e palha de cana ou qualquer outro material lignocelulósico, devido ao seu processo produtivo exigir algumas etapas que não encontram-se presentes no processo do etanol de primeira geração, sua produção necessita do domínio de tecnologias ainda não completamente desenvolvidas e que hoje são complexas, apresentando baixo rendimento na conversão da matéria-prima em bioetanol, balanço energético negativo e custo de produção elevado. Essas tecnologias estão associadas aos processos de deslignificação e às etapas de hidrólise (JARDINE et al., 2009).

Em razão desta peculiaridade existente na produção do etanol de segunda geração, seu custo de produção ainda é superior ao do etanol de primeira geração, não apresentando competitividade financeira. Por exemplo, considerando o uso de caldo de cana-de-açúcar,



enquanto o etanol 1G apresenta custo de produção de R\$ 1,20 por litro, o etanol 2G custa R\$ 1,50 por litro. Entretanto, as estimativas indicam que a partir de 2021 os custos do etanol de segunda geração irão reduzir (CNPEM, 2015).

A produção de etanol de segunda geração, de forma geral, engloba quatro principais etapas: pré-tratamento da biomassa, hidrólise com produção de açúcares fermentescíveis, fermentação dos açúcares e, por fim, a separação do produto por destilação (ARAÚJO et al., 2013).

Estes passos podem ser observados na Figura 1.8, na qual nota-se a presença das duas etapas extras do processo 2G com relação ao processo 1G: o pré-tratamento da matéria-prima e a hidrólise.

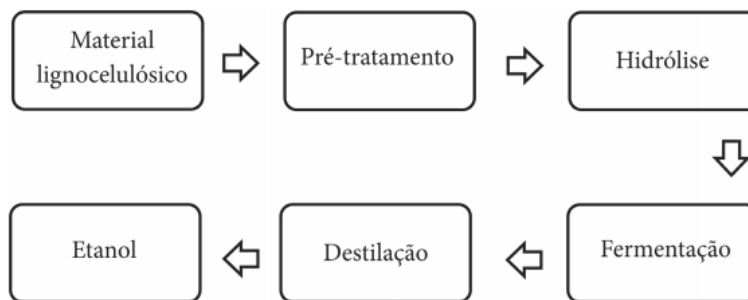


Figura 1.8 - Processo simplificado da produção de etanol de segunda geração (NUNES et al., 2013).

A Figura 1.9, por sua vez, é um comparativo entre três rotas que baseiam-se em diferentes matérias-primas para a produção de bioetanol. A primeira delas usa biomassa açucarada, mais comumente cana-de-açúcar e beterraba, a segunda usa fontes amiláceas (por exemplo, milho, trigo e mandioca) e a terceira, biomassa lignocelulósica.

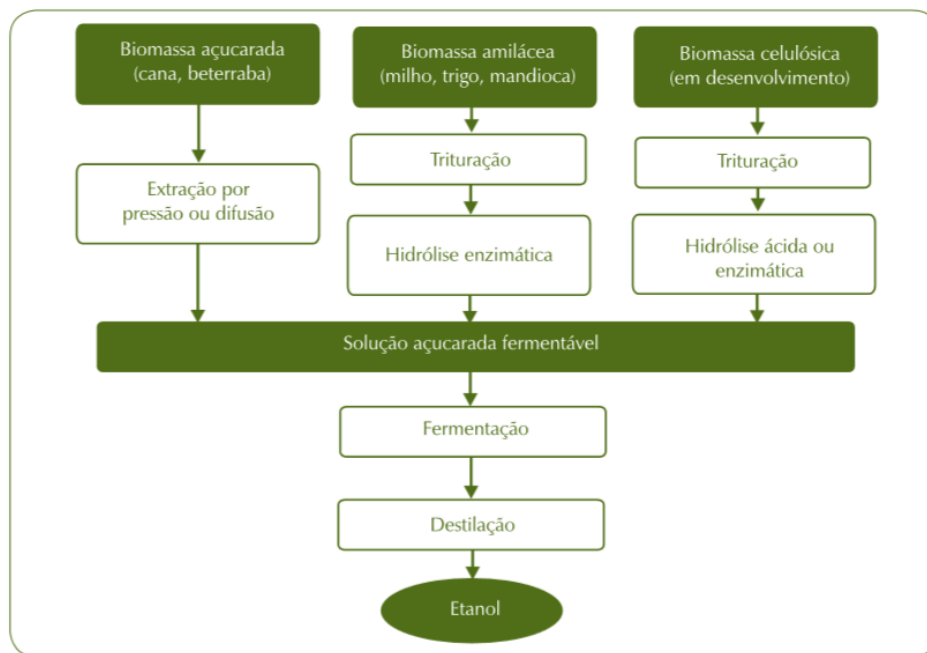


Figura 1.9 - Comparação entre diferentes rotas tecnológicas de produção de bioetanol (BNDES; CGEE, 2008).

Dessa forma, com o intuito de romper as barreiras existentes à produção de etanol 2G, muitas pesquisas têm sido realizadas, buscando tanto o desenvolvimento de tecnologias de produção quanto à melhoria da matéria-prima utilizada.

Ao redor do mundo, um número cada vez maior de pesquisadores, estimulados por políticas de pesquisa voltadas para o aumento da produtividade no setor bioenergético, encontram-se atuando nesta área (MARQUES, 2009 apud ARAÚJO et al., 2013). Entretanto, apesar de apenas recentemente as pesquisas terem sido intensificadas, a busca por processos que permitissem a obtenção de etanol lignocelulósico já é antiga.

A ideia de extrair álcool a partir de madeira, por meio de sua hidrólise e fermentação, por exemplo, foi publicada em 1819. Em 1894 um tratamento de serragem com ácidos diluídos a alta pressão foi realizado, rendendo de 7,5 a 9 litros de álcool a cada 100 kg de madeira seca. Em 1910, implantou-se em larga escala, na América do Norte, a produção de álcool a partir de serragem, mais especificamente serragem de pinus (BOULLANGER, 1924 apud SILVA, 2012).

No Brasil, os estudos sobre etanol 2G iniciaram-se em 1970, quando o país buscou tecnologia ofertada pela ex-União Soviética, iniciando-se o projeto COALBRA, que contou com a instalação de uma usina experimental em Uberlândia, com capacidade para 30 mil L/dia, a qual utilizava como matéria-prima a floresta de eucalipto existente no triângulo

mineiro. Porém, por causa de diversos fatores, o processo não foi satisfatório (LIMA; MARCONDES, 2002; SCHLITTLER; PEREIRA-JUNIOR, 2008 apud SILVA, 2012).

Desde então, muitas pesquisas, iniciativas públicas e também privadas têm sido desenvolvidas com o intuito de tornar o etanol lignocelulósico um biocombustível competitivo. Como exemplo, pode-se citar o Plano Conjunto BNDES-Finep de Apoio à Inovação Tecnológica Industrial dos Setores Sucroenergético e Sucroquímico - PAISS, que disponibilizou recursos para a implementação de plantas comerciais de etanol de segunda geração (MILANEZ et al., 2015).

Atualmente, o Brasil possui duas usinas de produção de etanol 2G. A primeira entrou em operação em setembro de 2014. Chamada de Bioflex 1, trata-se de uma unidade industrial da empresa GranBio e encontra-se instalada no município de São Miguel dos Campos, Alagoas. Sua capacidade de produção é de 82 milhões de litros de biocombustível por ano (GRANBIO, 2017).

Em julho de 2015, a empresa Raízen inaugurou a segunda usina de etanol 2G, a Unidade Costa Pinto, em Piracicaba (SP). Somando-se a construção da usina e a instalação dos equipamentos necessários, o investimento foi de quase R\$ 250 milhões (NOVACANA, 2017c).

Entretanto, a situação destas usinas ainda não é a mais favorável possível. Na GranBio, o avanço do planejamento montado após o início da produção do etanol 2G tem apresentado atrasos. De acordo com a empresa, o cronograma de investimentos e de metas de produção do biocombustível foi modificado devido aos problemas tecnológicos e à crise econômica, mas espera que em 2019 seu etanol de segunda geração encontre-se competitivo assim como o de primeira geração (NOVACANA, 2017b).

Na Raízen, a visão é semelhante, pois mesmo com o fato de que até o momento o etanol de segunda geração não possui um volume de produção significativo, acredita que o aproveitamento da biomassa continua sendo uma opção para mudar o futuro do setor sucroenergético e, assim, a companhia sinaliza que pode renovar suas apostas no etanol 2G. Neste sentido, a meta da empresa para a produção da safra 2017/2018, é de 15 a 20 milhões de litros, montante superior ao dobro do que foi registrado na safra anterior, quando a produção ficou em apenas 7,1 milhões de litros. Entretanto, estas novas perspectivas continuam inferiores à capacidade instalada, de 42 milhões de litros (NOVACANA, 2017c).

Além destas duas usinas brasileiras, ainda existem mais cinco usinas produtoras de etanol de segunda geração, distribuídas entre Canadá (Enerkem), Estados Unidos da América (Abengoa, Dupont e Poet-DMS) e Itália (BetaRenewables) (NOVACANA, 2016b).

Para o BNDES, independentemente de todas as dificuldades existentes, o Brasil é pioneiro na área, em razão tanto do grande número de projetos em execução quanto por oferecer biomassa barata e apresentar previsão de crescimento das lavouras de cana-energia (CNPEM, 2016).

#### **1.4 - Objetivo geral**

Diante da análise dos fundamentos apresentados anteriormente, a qual evidencia as atuais necessidades do planeta no que refere-se às fontes de energia, e devido ao interesse que tem surgido na produção em escala comercial do etanol de segunda geração, o presente Trabalho de Conclusão de Curso tem como objetivo geral realizar uma revisão bibliográfica sobre o processo produtivo deste biocombustível.

#### **1.5 - Objetivos específicos**

Já os objetivos específicos são:

- 1 - Apresentar as matérias-primas usadas na produção de etanol de segunda geração;
- 2 - Descrever os principais métodos de pré-tratamento empregados;
- 3 - Discorrer sobre a etapa de hidrólise;
- 4 - Descrever a etapa de fermentação do material hidrolisado.

## CAPÍTULO 2

### MATÉRIAS-PRIMAS EMPREGADAS

#### 2.1 - Materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos consistem em uma matéria-prima com potencial para diferentes fins, desde a cogeração de energia, produção de etanol 2G, até a obtenção de outros produtos usados em diversos segmentos industriais, isto porque são renováveis, abundantes e apresentam baixos custos (BINOD et al., 2010; DEMIRBAS, 2003; YAMASHITA et al., 2008 apud SANTOS, 2012).

As matérias-primas lignocelulósicas são compreendidas em sua maioria por materiais agroindustriais, resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas (COUGHLAN; MCHALE, 1988 apud NUNES et al., 2013). Dentre estas, materiais agroindustriais possuem o maior destaque, visto que apresentam-se na forma de resíduos gerados após o processamento de diferentes matérias-primas (NUNES et al., 2013).

Alguns exemplos de resíduos agrícolas classificados como materiais lignocelulósicos são o bagaço e a palha de cana-de-açúcar, cascas, gramíneas e resíduos florestais, que são comumente queimados ou descartados, mas possuem características desejáveis para serem aplicados na produção de etanol de segunda geração (JARDINE et al., 2009).

Como a maioria das matérias-primas lignocelulósicas usadas industrialmente trata-se de resíduos de outras atividades, surgem vantagens de sua aplicação. Pode-se citar os resíduos agroindustriais e florestais, que são empregados na produção de biocombustíveis, produtos químicos e de energia, visto que a sua disponibilidade soluciona o problema de acúmulo de resíduos e ainda evita que solos e rios sejam contaminados (NUNES et al., 2013).

A Tabela 2.1 apresenta, além das já citadas, mais algumas matérias-primas lignocelulósicas e também mostra detalhes da composição de cada uma delas.

Tabela 2.1 - Composição química de diferentes biomassas lignocelulósicas (GÓMEZ et al., 2010 apud SANTOS, 2013).

<b>Biomassa lignocelulósica</b>	<b>% Celulose</b>	<b>% Hemicelulose</b>	<b>% Lignina</b>
Palha de cana	40 - 44	30 - 32	22 - 25
Bagaço de cana	32 - 48	19 - 24	23 - 32
Madeira dura	43 - 47	25 - 35	16 - 24
Madeira mole	40 - 44	25 - 29	25 - 31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,30
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38 - 40	28	7 - 21
Fibra de coco	36 - 43	0,15 - 0,25	41 - 45
Fibra de bananeira	60 - 65	6 - 8	5 - 10
Palha de cevada	31 - 45	27 - 38	14 - 19

Observando-se a tabela anterior, é possível notar que as fontes de compostos lignocelulósicos com características favoráveis à produção de etanol 2G incluem diferentes tipos de materiais, podendo ser bastante variadas.

Entretanto, os resíduos lignocelulósicos mais promissores para emprego em bioprocessos são o bagaço de cana, a palha de arroz, de milho e de trigo, provenientes da América do Sul, Ásia, Estados Unidos e Europa, respectivamente (CHENG et al., 2008; KADAM; McMILLAN, 2003 apud SANTOS, 2012). O potencial produtivo de alguns destes resíduos pode ser observado na Tabela 2.2, a qual mostra a produção de etanol a partir da fração celulósica contida na matéria-prima. Nesta tabela, nota-se que a conversão de celulose em etanol para a palha de cana, palha de trigo e bagaço de cana é superior a 80%.

Tabela 2.2 - Capacidade produtiva de etanol de segunda geração no Brasil a partir de algumas biomassas lignocelulósicas em função da porcentagem de celulose, do seu potencial de conversão em etanol e da produção anual de cada matéria-prima (NUNES et al., 2013).

<b>Resíduo</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Conversão de celulose em etanol (%)</b>	<b>Produção residual anual (toneladas)</b>	<b>Produção de bioetanol (L)</b>
Palha de cana	39	85 <sup>1</sup>	208 <sup>6</sup> milhões	87,38 bilhões
Palha de trigo	35	89 <sup>2</sup>	6 <sup>7</sup> milhões	2,37 bilhões
Palha de arroz	38	80 <sup>3</sup>	3 <sup>8</sup> milhões	1,15 bilhões
Bagaço de cana	43	89 <sup>4</sup>	208 <sup>9</sup> milhões	100,88 bilhões
Pseudocaule de bananeira	46	61 <sup>5</sup>	50 <sup>10</sup> milhões	17,78 bilhões

Fonte: 1 - Silva (2009); 2 - Santos, F. et al. (2012); 3 - Monteiro et al. (2010); 4 - Silva (2009); 5 - Silva (2009); 6 - Rocha et al. (2011); 7 - Ferreira-Leitão et al. (2010); 8 - Mayer et al., 2006; 9 - Rocha et al. (2011); 10 - Rosa et al. (2011).

Com relação à sua estrutura, os materiais lignocelulósicos são compostos por celulose, hemicelulose, lignina, extrativos, cinzas e outros componentes menos representativos (LIMA, 2013). A celulose e a hemicelulose, que são os mais significativos, consistem em aproximadamente 70% da biomassa total e são formadas por polímeros de monômeros de açúcares fermentescíveis, já a lignina é constituída por material polifenólico (LIMA, 2013).

A Figura 2.1 mostra de forma geral como é a disposição da celulose, hemicelulose e lignina na estrutura da parede celular dos compostos lignocelulósicos.

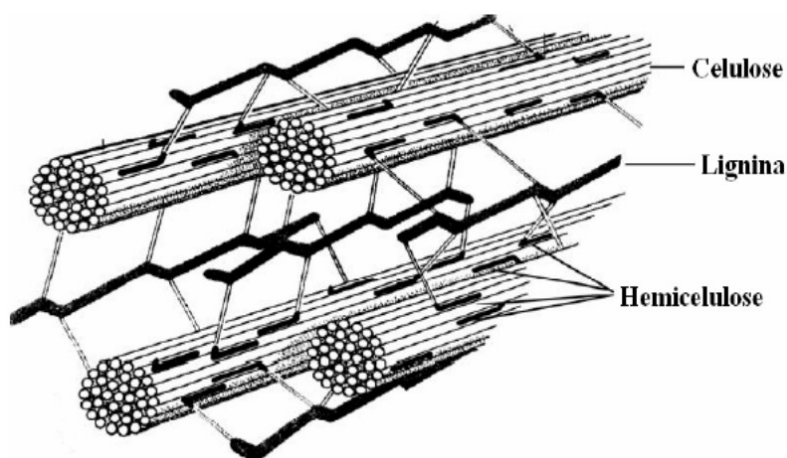


Figura 2.1 - Visão geral da parede celular vegetal (MURPHY; MCCARTHY, 2005 apud BERNARDO NETO, 2009).

### 2.1.1 - Celulose

A celulose é um composto polimérico que possui como unidade básica de repetição a celobiose, que por sua vez trata-se de um dímero de glicose, cujas moléculas encontram-se unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. Formada por muitas camadas unidas por forças de Van der Waals, a função da celulose é, portanto, dar forma e oferecer suporte e proteção às células vegetais. Em sua estrutura existem vários grupos hidroxila interligados por ligações de hidrogênio, tanto intra quanto intermoleculares (PIETROBON, 2008 apud ARAÚJO et al., 2013). Na Figura 2.2 é possível observar a estrutura da celulose e também as ligações existentes entre os grupos hidroxila.

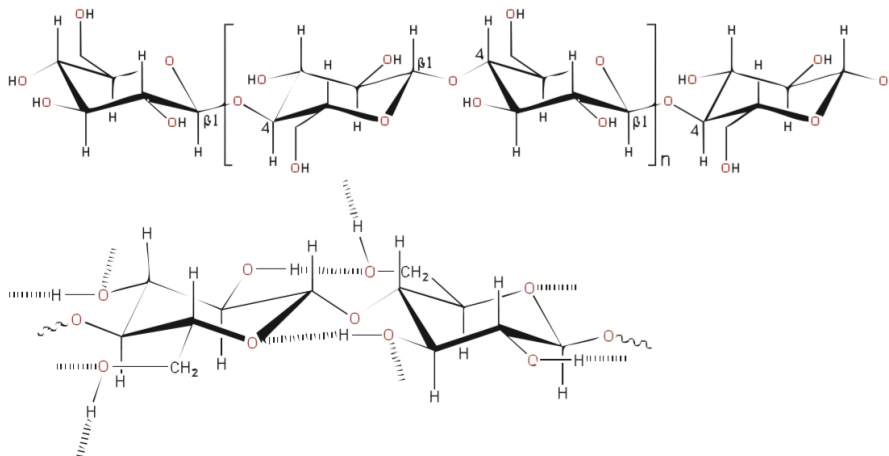


Figura 2.2 - Polímero de celulose com as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (JARDINE et al., 2009).

As cadeias de celulose, também chamadas de fibrilas elementares, possuem estrutura rigorosamente ordenada, existindo duas regiões, a cristalina e a amorfa. A região cristalina apresenta as moléculas dispostas de forma ordenada, enquanto a região amorfa possui uma orientação menor entre as moléculas e, dessa forma, é hidrolisada mais facilmente (FENGEL; WEGENER, 1989 apud LIMA, 2013).

A trama de celulose é formada pela agregação de inúmeras fibrilas, sendo que cada fibrila surge da união de aproximadamente 250 microfibrilas, as quais são formadas pelas fibrilas elementares, pequenos números de feixes de molécula de celulose, que por fim, é constituída por várias moléculas de glicose (FENGEL; WEGENER, 1991 apud SANTOS 2012).

Pode-se, de forma geral, identificar a celulose pela sua fórmula molecular bruta,  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , em que n representa o número de moléculas de glicose, que pode ser de até



15.000 unidades, indicando o grau de polimerização da celulose, o qual influencia a resistência de sua estrutura (MACHADO, 2009).

Não apenas o grau de polimerização da celulose varia, mas também o grau de cristalinidade, assumindo valores de 50 a 70%, que dependem da origem da celulose e processo de obtenção. Por meio de difração de raios X, medidas mostram que a cada 500 Angstroms de região cristalina, surgem regiões amorfas, que devido à maior área superficial apresentam maior facilidade de penetração de água em suas fibras e, portanto, menor resistência às ações externas (JARDINE et al., 2009). A Figura 2.3 representa como as regiões cristalinas e amorfas encontram-se dispostas na estrutura da celulose.

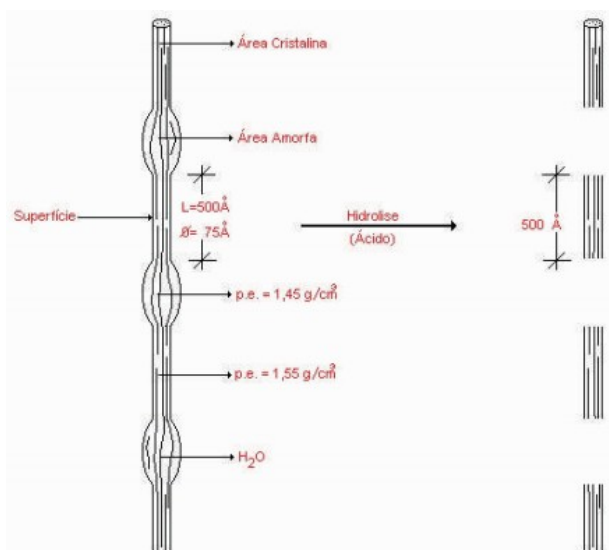


Figura 2.3 - Regiões cristalinas e amorfas na estrutura da celulose (KLOCK, 2013).

### 2.1.2 - Hemiceluloses

As hemiceluloses são muito importantes na constituição da parede celular das plantas, isto porque encontram-se ligadas às microfibrilas de celulose, o que promove a sua elasticidade e impede que elas se toquem (RAMOS, 2003). Assim como a celulose, as hemiceluloses são polissacarídeos, entretanto classificadas como heteropolissacarídeos, pois são constituídas por diferentes unidades de açúcares pertencentes aos grupos das pentoses, hexoses, ácidos hexourônicos e desoxiexoses (SANTOS, 2012).

Esses polissacarídeos são formados, principalmente, por cadeias poliméricas ramificadas, cujo grau de polimerização varia de 100 a 200 unidades de açúcares, que incluem: glicose, galactose, manose, xilose, ramnose e arabinose. Estas são amorfas, possuem baixa massa molecular e podem ser lineares ou ramificadas. Além disso, as hemiceluloses

podem ter em sua composição a presença de ácidos orgânicos, como o ácido glucurônico (LIMA; RODRIGUES, 2007).

As hemiceluloses apresentam-se divididas em quatro polissacarídeos não celulósicos, xilanas, mananas, galactanas e galacturonanas, que possuem suas unidades monossacarídicas unidas por ligações do tipo glicosídicas (SZENGYEL, 2000 apud SANTOS 2012).

A Figura 2.4 apresenta as estruturas dos principais monossacarídeos que compõem as hemiceluloses e a Figura 2.5 mostra a estrutura geral de uma hemicelulose.

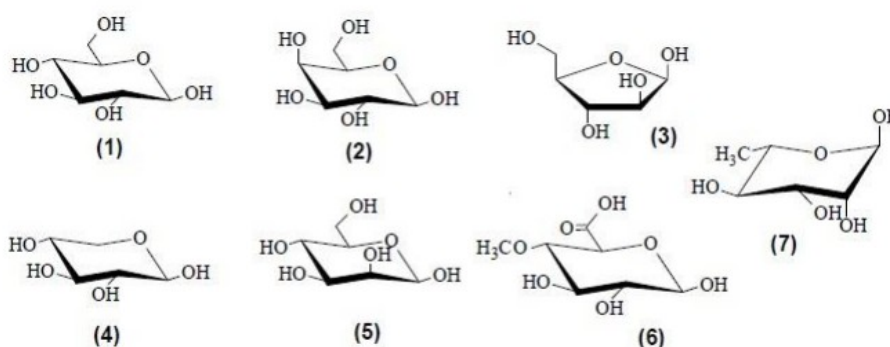


Figura 2.4 - Monossacarídeos constituintes da hemicelulose. (1) D-glicose, (2) D-galactose, (3) L-arabinose, (4) D-xilose, (5) D-manose, (6) 4-O-metil-D-glucurônico, (7) L-ramnose (SJÖSTRÖM; WESTERNARK, 1999 apud PITARELO, 2013).

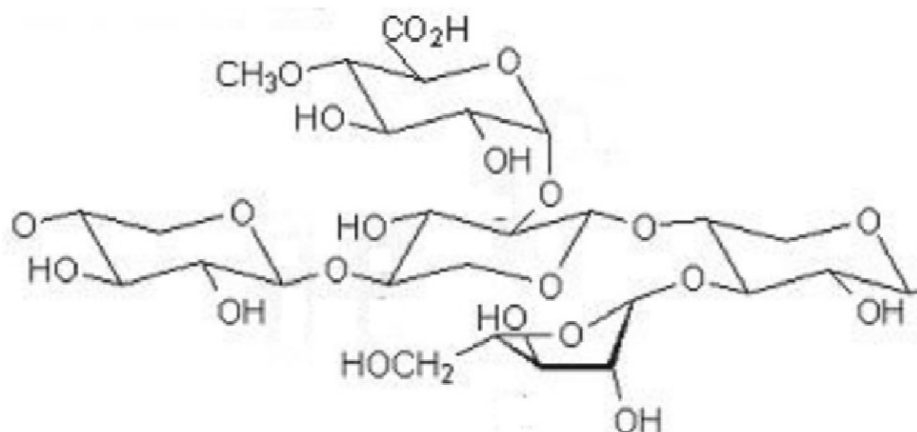


Figura 2.5 - Estrutura molecular de uma hemicelulose (ROSA; GARCIA, 2009).

Por causa de sua constituição heterogênea, a hemicelulose é o componente da parede celular mais susceptível à hidrólise, o que facilita a obtenção de açúcares fermentescíveis como a xilose, que por sua vez pode originar diferentes produtos de interesse, dentre eles, o etanol (LIMA, 2013).

### 2.1.3 - Lignina

A lignina é outro composto de extrema importância para os vegetais, pois atua como agente adesivo e confere rigidez e firmeza à sua estrutura de celulose, assim como representa uma barreira contra a degradação enzimática e microbiana da parede celular (FENGEL; WEGENER, 1989 apud RAMOS, 2003). Além disso, possui importante função no transporte de água, nutrientes e metabólitos. Uma vez degradada libera compostos fenólicos, alcoóis aromáticos e aldeídos (LIMA, 2013).

Este composto encontra-se depositado juntamente com os carboidratos na parede celular das plantas, formando ligações covalentes com os monossacarídeos da hemicelulose (CARVALHO, 2011).

Em termos estruturais, trata-se de um polímero completamente amorfo e de composição complexa, sendo, majoritariamente, formado por compostos aromáticos e de elevado peso molecular, insolúvel em água e muito resistente às reações químicas (BETINI, 2006; CELULOSE ONLINE, 2007 apud MACHADO, 2009).

A unidade básica de repetição da lignina é o fenilpropano e este é formado pela união de alcoóis do tipo hidroxicinâmicos, mais especificamente o álcool cumarílico, o coniferílico ou ferrúlico e o sinapílico, conectados por diferentes ligações (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009 apud DRABER, 2013). A proporção desses três monômeros varia entre as espécies de plantas, assim, o grupo aromático característico da lignina pode ser o p-hidroxibenzil (derivado do álcool p-cumarílico), o guaiacil (derivado do álcool coniferílico) ou o siringil (derivado do álcool sinapílico) (RAMOS, 2003). As estruturas desses alcoóis encontram-se representadas na Figura 2.6.

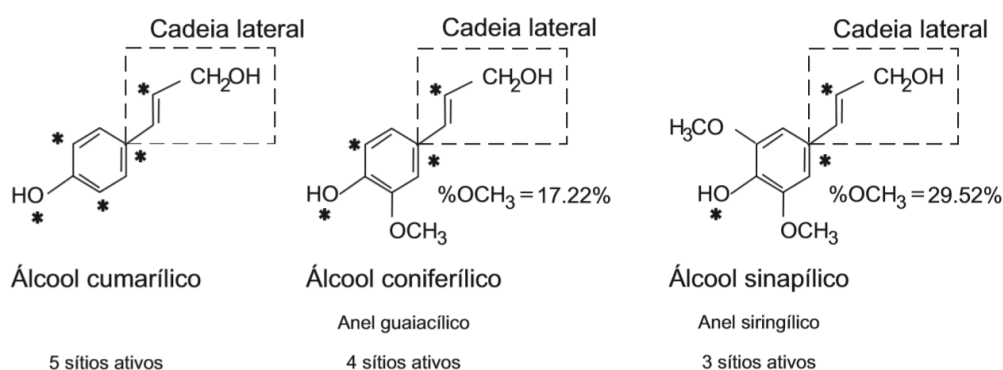


Figura 2.6 - Principais precursores da lignina (MARTINS, 2005).

Já a Figura 2.7 mostra a estrutura da lignina.

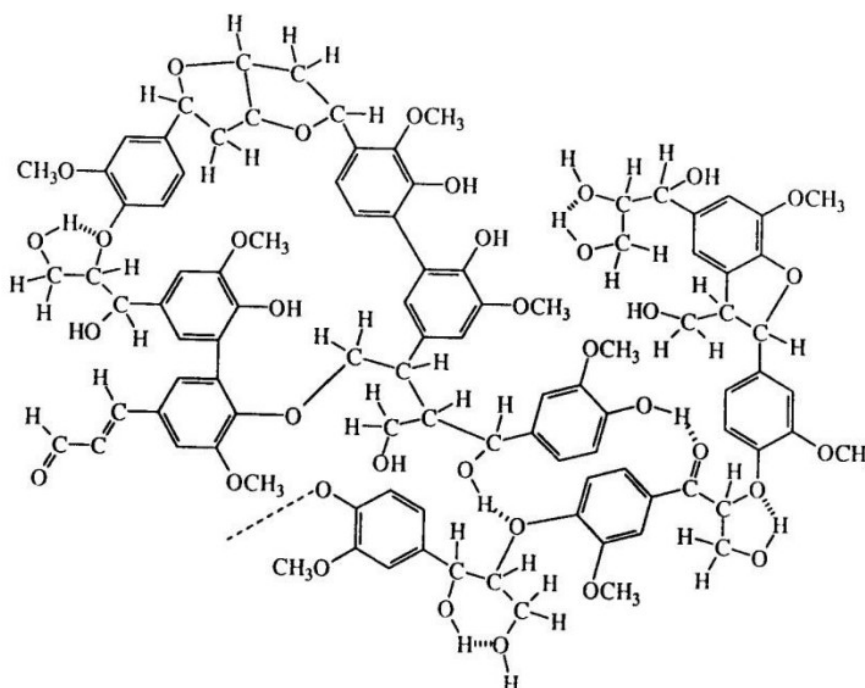


Figura 2.7 - Representação da estrutura da lignina (ROSA; GARCIA, 2009 apud DRABER, 2013).

Portanto, como a estrutura bioquímica da lignina, diferentemente da celulose e hemicelulose, não possui moléculas de açúcares, esta não é empregada na produção de etanol de segunda geração (PEREIRA JR. et al., 2008 apud ANDRADE, 2014). Porém, visto que a lignina apresenta uma estrutura rica em compostos aromáticos, mostra-se como fonte de valiosos insumos para a indústria química, valendo ressaltar apenas que a sua aplicação subsequente depende do processo utilizado para separá-la dos demais componentes lignocelulósicos (D'ALMEIDA, 1988 apud ANDRADE, 2014; SANTOS, 2011).

De forma geral, além do uso energético, pode-se citar como possíveis aplicações para a lignina seu emprego na indústria de cimento e concreto, em pastilhas de ração animal, na indústria de pesticidas, em lamas de produção de petróleo, na produção de dispersantes, emulsificantes e agentes umectantes em geral, como micronutriente agrícola, em atividades antimicrobianas, em baterias ácidas de chumbo, no tratamento de água e agentes de limpeza industrial, na indústria de fertilizantes, na indústria de polímeros, cerâmicos, corantes e pigmentos, na produção de resinas fenólicas, como adsorvente natural, na obtenção de vanilina, na fabricação de adesivos para madeira, como retardador de chama, como agente de liberação lenta para os produtos agrícolas e farmacêuticos, como surfactante, como

antioxidante, como extensor de asfalto e nos setores de pintura, revestimento e pavimentação (SANTOS, 2011).

Assim, tal fato tem representado uma oportunidade do processo de produção de etanol de segunda geração utilizar a lignina obtida como uma fonte de recursos financeiros mais efetiva do que a sua simples queima para cogeração de energia, o que pode compensar os maiores custos existentes nas etapas de pré-tratamento e hidrólise para obtenção do etanol 2G e, por consequência, permitir que este entre no mercado com um preço compatível com o do etanol de primeira geração.

## CAPÍTULO 3

### PRINCIPAIS MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO

O pré-tratamento é realizado com o intuito de aumentar a área superficial da biomassa, elevar a sua porosidade e reduzir a cristalinidade da celulose (SANTOS, 2012). Isto porque a lignina envolve a superfície celulósica, impossibilitando o acesso dos agentes promotores da hidrólise às fibras. Com o pré-tratamento do material lignocelulósico, a sua estrutura cristalina é quebrada, a lignina é removida e, por consequência, a celulose e hemicelulose ficam expostas às ações externas (OGEDA; PETRI, 2010).

A depender das condições nas quais o pré-tratamento é realizado, além da separação dos constituintes da lignocelulose, também é possível viabilizar a hidrólise seletiva da hemicelulose, que origina no meio pentoses que são diretamente fermentescíveis (LIMA, 2013).

O resultado da execução deste processo encontra-se representado na Figura 3.1.

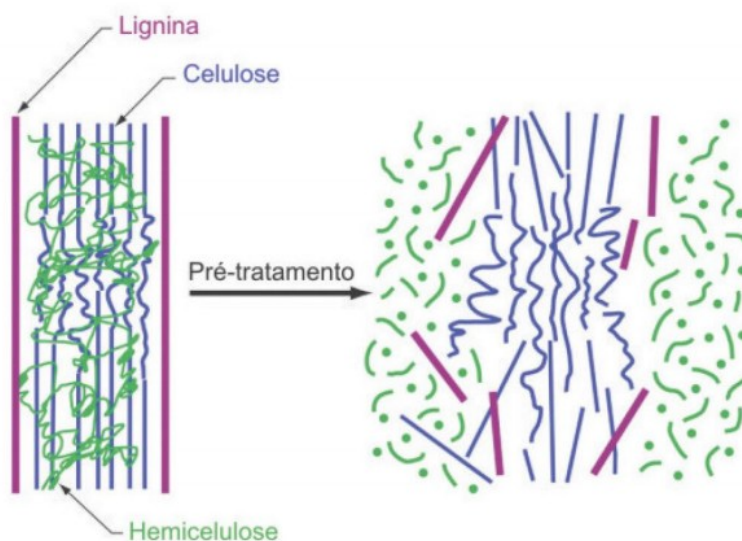


Figura 3.1 - Efeito do pré-tratamento na estrutura da lignocelulose (SANTOS et al., 2012).

A fase de pré-tratamento é uma das mais relevantes em termos de custos diretos e, além disso, ainda influencia nos custos tanto de etapas anteriores, preparação da matéria-prima, por exemplo, quanto nos custos de etapas posteriores, no caso, a hidrólise, fermentação, purificação de produtos intermediários, tratamento de resíduos, agitação

mecânica, consumo de energia, etc. (LEE et al., 1994; LYND et al., 1996; MOSIER et al., 2003 a, b apud DRABER, 2013).

Devido à grande contribuição com os custos do processo, esta etapa deve ter elevado rendimento, seletividade, simplicidade operacional, segurança, higiene industrial e atributos ambientais, consumir poucos insumos químicos, energia e utilidades (BAUDEL, 2006).

Além desses fatores, também deve ser observado se o pré-tratamento origina fibras reativas, mantém a fração hemicelulósica útil e não libera compostos inibidores da hidrólise e fermentação realizadas posteriormente (LYND, 1996 apud SILVA, 2012).

O processo de obtenção de etanol 2G pode ser feito sem o pré-tratamento da matéria-prima, entretanto a eficiência das etapas subsequentes, hidrólise e fermentação, aumenta consideravelmente com a realização do mesmo (McMILLAN, 1994 apud SANTOS, 2012). Isto porque quando a biomassa é hidrolisada sem submissão ao pré-tratamento, obtém-se um rendimento menor que 20%, o que é devido às suas características estruturais (alta cristalinidade, baixa porosidade, revestimento por lignina, etc.) (HAMELINCK et al., 2005 apud ARAÚJO et al., 2013).

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos é feito por meio de métodos químicos, físicos, biológicos ou até mesmo de uma combinação destes. O procedimento utilizado depende do grau de separação entre celulose, hemicelulose e lignina que é requerido, assim como do fim proposto após a separação, ou seja, do processo selecionado para realização das etapas de hidrólise e fermentação (DRABER, 2013).

Pode-se perceber o impacto da realização do pré-tratamento da biomassa quando a diferença estrutural existente entre o material submetido ao pré-tratamento e o que não passa por tal procedimento é analisada. A Figura 3.2, por exemplo, apresenta micrografias eletrônicas de varredura de folhas de palmeira, sem pré-tratamento e após diferentes tipos de pré-tratamentos.

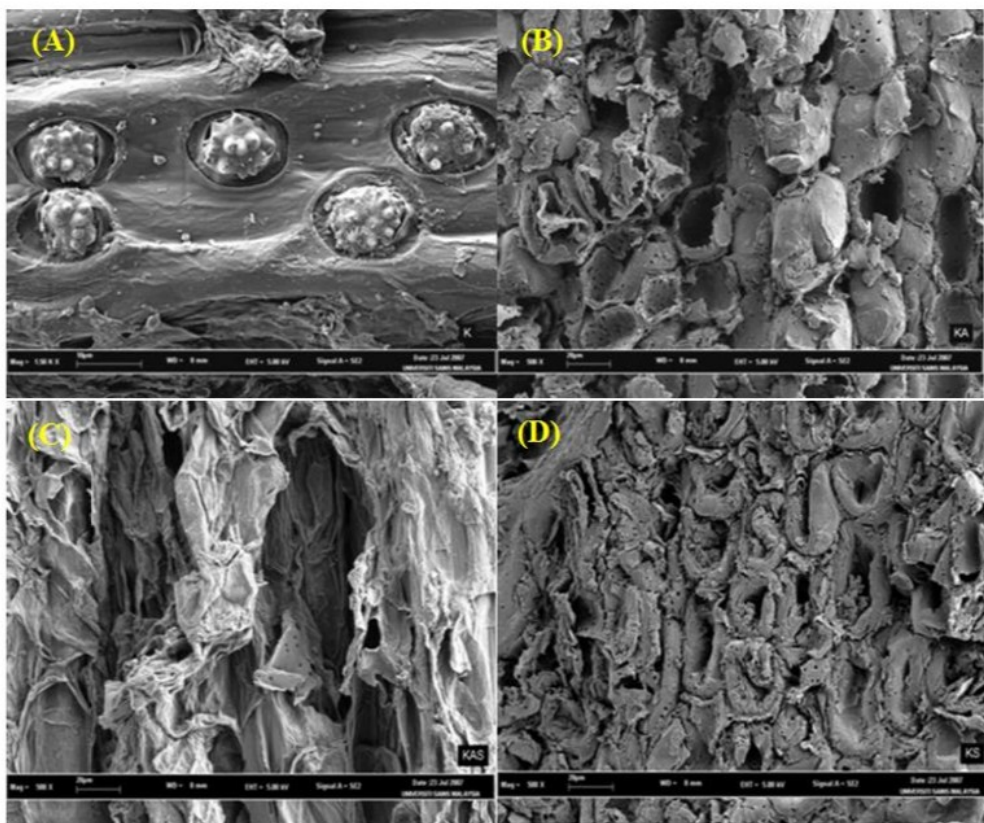


Figura 3.2 - Micrografias Eletrônicas de Varredura (MEV) para folhas de palmeira sem pré-tratamento (A) e submetidas a diferentes tipos de pré-tratamento, termo-hidrólise (B), ácido (C) e alcalino (D) (HONG et al., 2008 apud SUAREZ, 2014).

Após observá-la, verifica-se a importância da execução do pré-tratamento do material lignocelulósico, pois este permite alterar a estrutura da biomassa de forma que sua área superficial e sua porosidade aumentem e, portanto, seus componentes tornem-se mais expostos ao processo posterior de hidrólise, facilitando a atuação dos agentes promotores de tal etapa, sejam eles biológicos ou químicos.

O Quadro 3.1 mostra os quatro métodos de pré-tratamento utilizados e uma breve descrição de cada um deles, tanto no que diz respeito aos principais fatores responsáveis pelas alterações estruturais da biomassa quanto ao tipo de mudança que é causada.



Quadro 3.1 - Métodos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996 apud RABELO, 2010).

Métodos	Operações (fatores) que ocasionam mudança na estrutura do substrato	Tipo de mudança	Referências
Físico	Moagem e trituração (bola, energia vibratória, rolo duplo, pressão, martelo); radiação (raios de elétrons, raios gama, micro-ondas); altas temperaturas (pirólises, explosão a vapor).	Aumento da área superficial e tamanho dos poros da partícula, diminuição do grau de polimerização.	(AZUMA et al., 1985; KOULLAS et al., 1992; RAMOS et al., 1993b).
Químico	Bases, ácidos, gases, agentes oxidantes e redutores, solventes orgânicos.	Deslignificação, diminuição do grau de polimerização e cristalinidade da celulose associada com o inchaço da amostra, aumento da porosidade.	(BES et al., 1989; FARID et al., 1983; SZCZODRAK et al., 1986).
Biológico	Bolor branco ( <i>Pleurotus</i> , <i>Pycnoporus</i> , <i>Ischnoderma</i> , <i>Phlebia</i> , etc.).	Deslignificação e redução do grau de polimerização da celulose e hemicelulose.	(MES-HARTREE et al., 1987; ROLZ et al., 1986).
Combinado	Tratamento alcalino associado com explosão a vapor, moagem acompanhada com tratamento alcalino ou tratamento ácido.	Degradação da hemicelulose, deslignificação, aumento da área superficial e tamanho dos poros.	(PURI; PEARCE, 1989).

Já a Tabela 3.1 apresenta os principais pré-tratamentos existentes para cada método (físico, químico, biológico e combinado) e um resumo de suas características operacionais básicas.

Tabela 3.1 - Principais pré-tratamentos de material lignocelulósico e suas descrições (Elaborado com base em HAMELINCK et al., 2005 apud BNDES; CGEE, 2008).

Processo	Descrição	Tempo de reação	Rendimento de xilose	Custo*
<b>Físicos</b>				
Explosão de vapor	A biomassa triturada é tratada com vapor (saturado, 160°-260 °C) seguido de uma rápida descompressão	1-10 min	45%-65%	-
Termoidrólise	Utiliza água quente a alta pressão (pressões acima do ponto de saturação) para hidrolisar a hemicelulose	30 min	88%-98%	-
<b>Químicos</b>				
Hidrólise ácida	Por meio do uso de ácidos sulfúrico, clorídrico, ou nítrico, concentrados ou diluídos	2-10 min	75%-90%	+
Hidrólise alcalina	Pelo uso de bases, como hidróxidos de sódio ou cálcio	2 min	60%-75%	++
Organosolv	Uma mistura de um solvente orgânico (metanol, bioetanol e acetona, por exemplo) com um catalisador ácido (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCl) é usada para quebrar as ligações internas da lignina e da hemicelulose	40-60 min	70%-80%	
Biológico	Utilização de fungos para solubilizar a lignina. Geralmente, é utilizado em combinação com outros processos			
<b>Combinados</b>				
Explosão de vapor catalisada	Adição de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ou SO <sub>4</sub> ) ou CO <sub>2</sub> na explosão a vapor pode aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, diminuir a produção de compostos inibidores e promover uma remoção mais completa da hemicelulose	1-4 min	88%	-
Afex (ammonia fiber explosion)	Exposição à amônia líquida a alta temperatura e pressão por um certo período de tempo, seguida de uma rápida descompressão		50%-90%	
Explosão de CO <sub>2</sub>	Similar à explosão de vapor		75%	

\*O sinal + indica efeito vantajoso (menor custo).

Por sua vez, o Quadro 3.2 fornece uma noção quanto às vantagens, desvantagens e características composicionais de alguns tipos de pré-tratamento.

Quadro 3.2 - Alguns tipos de pré-tratamento de material lignocelulósico e suas características, vantagens e desvantagens (Adaptado de SANTOS et al., 2012 apud BRONZATO, 2016).

Pré-tratamentos		Características composicionais			Vantagens	Desvantagens
		Celulose	Hemicelulose	Lignina		
Físico	Moinho de bolas	Intensiva diminuição do grau de cristalinidade	Não remove	Não remove	Redução de cristalinidade	Alto consumo de energia
	Ácido diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Condições médias, alta produção de xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso
Químico	Hidróxido de sódio	Inchação significativa	Considerável solubilidade	Considerável solubilização, >50%	Remoção efetiva de ésteres	Reagente de alto custo, recuperação alcalina
	Organo-solv	Considerável inchação	Solubilização quase completa	Solubilização quase completa	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação	Recuperação de solvente, alto custo
Biológico	Micro biológico	20-30% de despolimerização	Acima de 80% de solubilização	Aproximadamente 40% de deslignificação	Baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise
Combinado	Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	Degradação da xilana como produto inibitório

Os pré-tratamentos indicados anteriormente e que são mais usados serão, a seguir, apresentados com mais detalhes, mas atenção maior será dada ao pré-tratamento por explosão a vapor, isto porque este é o processo mais consolidado até o momento, tanto na área acadêmica quanto na industrial.

### 3.1 - Pré-tratamentos físicos

Os pré-tratamentos físicos possuem como objetivo principal tornar a área superficial da celulose maior, reduzindo seu grau de cristalinidade, o que facilita a realização da etapa de

hidrólise. Esse tipo de processo tem como característica, na maioria das vezes, alto consumo de energia (SANTOS et al., 2012).

### 3.1.1 - Explosão a vapor

Um dos mais relevantes pré-tratamentos com relação à viabilização do processo produtivo de etanol 2G é a explosão a vapor, que possui como foco separar os componentes da lignocelulose (celulose, hemicelulose e lignina) e aumentar a suscetibilidade à hidrólise (PITARELO et al., 2012).

Para que isto seja possível, os materiais lignocelulósicos são, inicialmente, tratados em um reator com vapor, à pressão e temperatura elevadas (geralmente na faixa de 160 a 240 °C), durante um tempo de aproximadamente 20 minutos. Após isso, a pressão é reduzida, o que causa uma mudança repentina na temperatura, levando à ruptura das ligações entre a lignina, hemicelulose e celulose e a solubilização da hemicelulose (TENGBORD et al., 2001 apud DRABER, 2013).

Essa descompressão é feita a partir da rápida abertura da válvula do reator, permitindo que o seu conteúdo seja encaminhado para um tanque aberto, a pressão atmosférica. As consequências da descompressão na estrutura da biomassa surgem pelo fato de que uma vez em contato com o material a ser pré-tratado, o vapor penetra em suas fibras e condensa, ficando a água líquida formada em equilíbrio com o vapor à alta pressão não condensado, mas, durante a descompressão, por causa da redução súbita da pressão, esta água evapora, resultando em uma verdadeira explosão das fibras de biomassa (ALLEN et al., 2001; BABCOCK, 1932; MASON, 1926 apud SAAD, 2010).

A explosão causa não só a separação dos constituintes da lignocelulose, mas também a hidrólise dos polissacarídeos por auto-hidrólise, principalmente a hemicelulose, que é mais suscetível à reação, e a degradação da lignina (CHEN et al., 2008 apud OLIVEIRA, 2010).

Sob o efeito da temperatura e pressão, os grupos acetila nas hemiceluloses são hidrolisados a ácido acético, que após ser produzido atua como catalisador da quebra das ligações existentes entre a lignina e os carboidratos, provocando a solubilização das hemiceluloses, que podem ser removidas por extração aquosa. Por sua vez, a fração insolúvel em água contém celulose e lignina, já parcialmente modificada e que pode ser, quase que por completo, removida por extração com álcali, etanol ou dioxano (PITARELO, 2013).

Além de monossacarídeos, também são obtidos a partir da explosão a vapor oligômeros, de alta e baixa massa molar, e outros subprodutos, como hidroximetilfurfural,

furfural e ácido levulínico, advindos das reações de hidrólise e desidratação das hemiceluloses e da celulose (RAMOS, 2003).

A Figura 3.3 mostra com um pouco mais de detalhes os efeitos do processo de explosão a vapor nas estruturas da celulose e hemicelulose discutidos anteriormente.

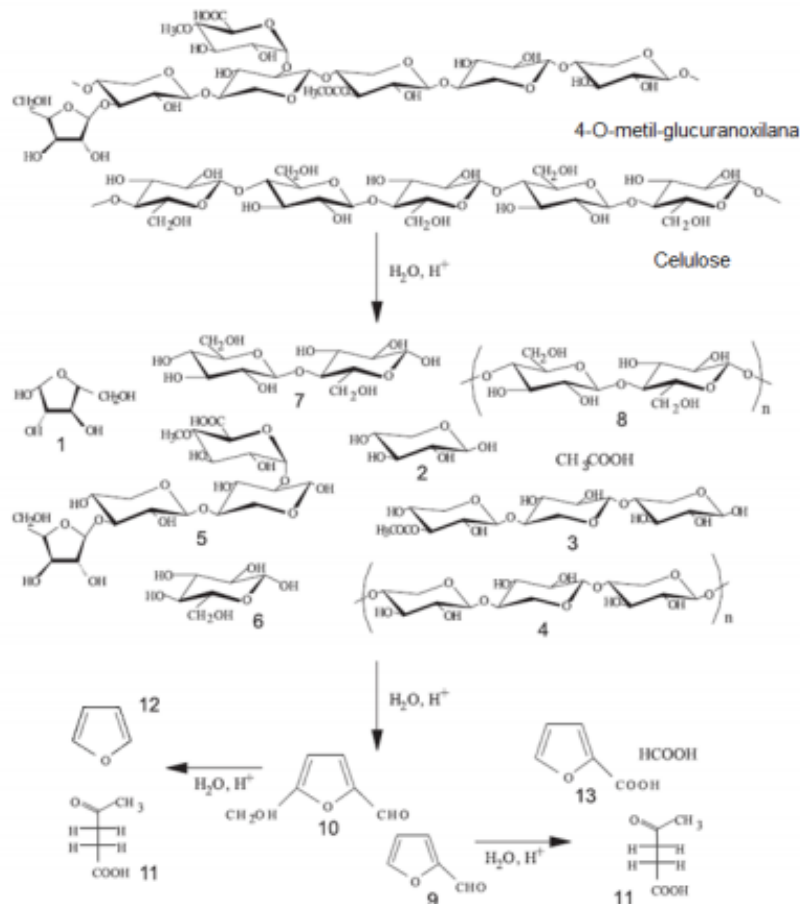


Figura 3.3 - Hidrólise de 4-O-metil-glucuranoxilana e celulose. (1) Arabinose, (2) xilose, (3) xilo-oligômeros acetilados, (4) xilo-oligômeros de grande massa molecular, (5) oligossacarídeos, (6) glicose, (7) celobiose, (8) celo-oligômeros, (9) furfural, (10) hidroximetilfurfural, (11) ácido levulínico, (12) furano, (13) ácido furóico. Ácido fórmico e ácido acético também são formados (RAMOS, 2003).

O processo de explosão a vapor possui duas vantagens significativas: custo de operação inferior ao dos processos de pré-tratamento químico e aumento da disponibilidade da celulose à etapa subsequente de hidrólise. Com relação aos custos, a diferença está no fato de que os pré-tratamentos que baseiam-se no uso de compostos químicos consomem grande quantidade de água, o que exige um sistema de aquecimento do reator mais caro (SAAD, 2010).

### **3.1.2 - Termo-hidrólise**

O princípio da termo-hidrólise é o mesmo da explosão a vapor, estando a diferença apenas no fato de que água quente e pressurizada é utilizada ao invés de vapor. Uma desvantagem desse processo é o grande consumo de água (BERNARDO NETO, 2009).

Já uma vantagem da termo-hidrólise é que devido à injeção de água, a solubilização da hemicelulose obtida por esse processo é maior que a verificada na explosão a vapor, reduzindo o risco de degradação do furfural e de precipitação da lignina (LASER et al., 2002 apud DRABER, 2013). Além disso, o rendimento em termos de recuperação da xilose, que varia de 88 a 98%, é maior do que na explosão a vapor, na qual este encontra-se entre 45 e 65%, o que torna a termo-hidrólise um processo ambiental e economicamente atrativo (HAMELINCK et al., 2005 apud DRABER, 2013).

## **3.2 - Pré-tratamentos químicos**

Os tipos de pré-tratamentos químicos diferenciam-se pelos compostos utilizados, assim como pelos mecanismos responsáveis pelas modificações estruturais e químicas da parede celular. Os mesmos podem usar ácidos, bases ou solventes orgânicos (BRODEUR et al., 2011 apud CHEMMÉS et al., 2013).

### **3.2.1 - Pré-tratamento ácido**

Também chamado por alguns autores de hidrólise ácida, utiliza como reagente para o pré-tratamento da biomassa, por exemplo, soluções de ácido acético, ácido clorídrico, ácido nítrico e ácido sulfúrico. Destas, a mais empregada tem sido a solução de ácido sulfúrico. A função do ácido da solução é reagir com a celulose, desfazendo a sua estrutura cristalina e levando-a para o estado amorfo (BRONZATO, 2016).

O pré-tratamento ácido pode ser feito de duas maneiras: com ácido concentrado (temperatura baixa e alta concentração de ácido) e com ácido diluído (alta temperatura e baixa concentração de ácido). Ácidos fortes são mais eficientes na quebra do complexo lignocelulósico do que ácidos fracos, mas são mais tóxicos e apresentam uma recuperação mais difícil (SATYANAGALAK SHMI et al., 2011; TAHERZADEH; KARIMI, 2008 apud BRONZATO, 2016).

### 3.2.2 - Pré-tratamento alcalino

Enquanto o pré-tratamento ácido promove a hidrólise da fração hemicelulósica, o pré-tratamento alcalino, também chamado de hidrólise alcalina, é empregado visando, principalmente, a remoção da lignina, levando à destruição da estrutura lignocelulósica e à separação das ligações entre lignina e carboidratos, o que reduz os graus de polimerização e cristalinidade e aumenta a porosidade das matérias-primas lignocelulósicas (SUN; CHENG, 2002 apud SANTOS, 2012).

Neste tipo de pré-tratamento, as condições utilizadas são brandas, ou seja, temperatura e pressão baixas e as substâncias químicas mais aplicadas são o hidróxido de sódio e o hidróxido de cálcio (MOISER et al., 2005 apud BERNARDO NETO, 2009).

### 3.2.3 - Organosolv

O processo de pré-tratamento conhecido como organosolv consiste no uso de uma mistura aquosa formada por organosolventes, ou seja, solventes orgânicos e catalisador ácido, mais comumente ácido clorídrico ou ácido sulfúrico. A ação dessa mistura no material lignocelulósico leva à quebra tanto da estrutura da lignina quanto da hemicelulose (DRABER, 2013).

Os solventes orgânicos mais usados são: metanol, etanol, acetona, etileno e glicerol. Após o pré-tratamento, estes solventes são drenados do reator, evaporados, condensados e reciclados. Essa remoção é necessária tanto para a redução de custos quanto porque os organosolventes possuem potencial inibitório ao desenvolvimento dos microrganismos durante a fermentação (HAMELINCK et al., 2005 apud DRABER, 2013).

Um importante exemplo prático da aplicação do pré-tratamento organosolv é o processo conhecido como DHR (Dedini Hidrólise Rápida). No DHR, o próprio etanol é usado como organosolvente (SOARES; OLIVÉRIO, 2008).

O objetivo desse processo é facilitar o acesso à celulose, após uma rápida dissolução da lignina pelo etanol. Como apresenta expressiva velocidade de formação de açúcares, o seu rendimento é favorecido (SOARES; OLIVÉRIO, 2008). Durante sua realização, o DHR desestrutura completamente a matriz formada pela lignina, hemicelulose e celulose, pois além de dissolver a lignina, também hidrolisa a hemicelulose e expõe a celulose à ação do ácido empregado (JARDINE et al., 2009).

As condições operacionais típicas do DHR são: solução de etanol a 75% e ácido diluído (por exemplo, solução com 0,25 a 0,5% de ácido sulfúrico), temperatura entre 180 e 200 °C e pressão entre 25 e 28 bar. Em tais condições, o rendimento encontra-se em torno de 65% (RIBEIRO, 2013). Já o tempo de duração da hidrólise da fração celulósica devido à atuação do ácido sulfúrico varia entre 10 e 15 minutos (JARDINE et al., 2009). A Figura 3.4 apresenta um esquema simplificado de como é realizado o processo DHR.

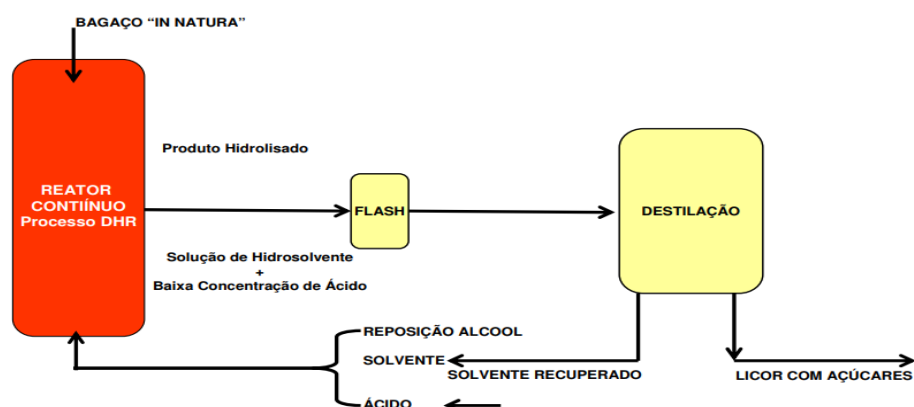


Figura 3.4 - Representação do processo DHR (SOARES; OLIVÉRIO, 2008).

### 3.3 - Pré-tratamentos biológicos

Conforme mencionado anteriormente, enquanto os pré-tratamentos químicos baseiam-se na aplicação de substâncias específicas, os processos de pré-tratamento biológico utilizam microrganismos, principalmente fungos, para tornarem a estrutura do material lignocelulósico mais acessível aos agentes promotores da hidrólise. Por tratar-se da aplicação de seres vivos, as condições de pressão e temperatura são brandas e a necessidade de energia é pequena (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008 apud BERNARDO NETO, 2009).

A atuação desses microrganismos dá-se a partir da secreção de enzimas extracelulares que permitem a remoção de grande parte da lignina da biomassa. Os principais agentes promotores de tal processo são os fungos de decomposição branca, que produzem enzimas como a lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e a lacase (BONONI, 1997; CHAGAS; DURRANT, 2001; CLOETE; CELLIERS, 1999 apud BORTOLAZZO, 2011).

A principal desvantagem desse procedimento é que inviabiliza sua aplicação industrial é o tempo de reação elevado (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008 apud BERNARDO NETO, 2009). Já uma importante vantagem identificada, é o alto grau de especificidade na degradação da estrutura da lignocelulose, o qual é conseguido por meio do uso de



microrganismos seletivos, o que previne a produção de substâncias tóxicas e inibitórias das etapas de hidrólise ou fermentação (BRONZATO, 2016).

### **3.4 - Pré-tratamentos combinados**

Os processos de pré-tratamentos combinados são assim chamados por tratarem-se de combinações dos pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos já desenvolvidos. Destes, o principal é a explosão a vapor catalisada.

#### **3.4.1 - Afex (ammonia fiber explosion)**

O processo é realizado em um reator que opera sob condições mais intensas de pressão e temperatura (160 a 180 °C), no qual há a introdução tanto do material lignocelulósico quanto da solução de amônia, que encontra-se entre 5 e 15 °C. Após a reação, é feito um rápido resfriamento e descompressão da solução (BERNARDO NETO, 2009).

Alguns pontos fracos deste processo e que dificultam o seu uso são: elevado custo da amônia, que deve ser recuperada para que o procedimento tenha viabilidade econômica, e degradação dos açúcares, o que prejudica as etapas posteriores (MOISER et al., 2005 apud DRABER, 2013). Além disso, apresenta baixo rendimento para materiais lignocelulósicos com elevado teor de lignina (BERNARDO NETO, 2009).

#### **3.4.2 - Explosão a vapor catalisada**

Este procedimento consiste na realização da explosão a vapor, conforme visto anteriormente, mas com a adição principalmente de ácido ou dióxido de carbono, responsáveis por reduzir a formação de inibidores das etapas posteriores de hidrólise e fermentação e ainda melhorar o aproveitamento da xilose (HAMELINCK et al., 2005 apud BERNARDO NETO, 2009).

##### **3.4.2.1 - Explosão de CO<sub>2</sub>**

A explosão de CO<sub>2</sub> é um método de pré-tratamento parecido com o Afex, estando a diferença entre eles no fluido que é empregado no processo reacional, que ao invés de solução de amônia é dióxido de carbono, e no fato de que no Afex não há a presença de vapor. O uso

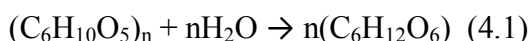
de CO<sub>2</sub> leva à formação de ácidos que promovem a hidrólise da hemicelulose. A vantagem desse processo com relação ao Afex é o custo inferior (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009 apud DRABER, 2013).

## CAPÍTULO 4

### HIDRÓLISE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Após a etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico, o próximo passo da produção do etanol de segunda geração é a hidrólise propriamente dita, que tem como objetivo originar, a partir dos polissacarídeos constituintes da biomassa, monossacarídeos, ou seja, açúcares diretamente fermentescíveis.

Como durante o pré-tratamento, a depender de suas condições operacionais, a hemicelulose pode ser quase que completamente hidrolisada, nesta etapa basicamente a celulose será hidrolisada, originando glicose no meio reacional. A reação de quebra da molécula da celulose em glicose é representada pela Equação 4.1 (BALAT et al., 2008).



Um grande número de processos para hidrolisar a celulose em glicose tem sido desenvolvido, mas as duas principais técnicas de hidrólise empregadas são a hidrólise ácida e a enzimática (BALAT et al., 2008), estando a diferença entre elas apenas no tipo de catalisador utilizado. A hidrólise ácida envolve o uso de ácido como catalisador, podendo este ainda ser concentrado ou diluído, e a enzimática, enzimas específicas. Uma comparação, em termos de condições de operação e de rendimento, entre as três diferentes formas de hidrólise da celulose encontra-se apresentada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Comparação entre as opções para a hidrólise da celulose (Elaborado com base em HAMELINCK et al., 2005 apud BNDES; CGEE, 2008).

<b>Processo</b>	<b>Insumo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Sacarificação</b>
Ácido diluído	< 1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	215 °C	3 min	50% - 70%
Ácido concentrado	30% - 70% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40 °C	2 - 6 h	90%
Enzimático	Celulases	70 °C	1,5 dias	75% - 95%

Observa-se pela tabela que na hidrólise ácida, principalmente quando realizada com ácido diluído, a conversão é mais rápida, exigindo um controle minucioso da reação para evitar a formação de produtos indesejados e de inibidores. Já na hidrólise enzimática, o controle do meio de reação é que representa o fator crucial para a eficiência do processo, visto

que as enzimas possuem ações específicas que dependem fortemente do meio em que atuam (OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2006 apud ARAÚJO, 2013).

#### 4.1 - Hidrólise ácida

A hidrólise ácida consiste na aplicação de ácido forte para que este ataque as ligações existentes entre os monossacarídeos dos polissacarídeos, podendo ser usado ácido sulfúrico, clorídrico ou trifluoroacético. A diferença entre estes três deve-se à forma como atuam, pois os ácidos sulfúrico e clorídrico atacam a celulose e a hemicelulose de forma similar, mas o ácido trifluoroacético hidrolisa preferencialmente as ligações mais fracas existentes entre os monossacarídeos, ou seja, as ligações do tipo  $\alpha$ , que caracterizam as ramificações das hemiceluloses (BUCKERIDGE et al., 2010).

A Figura 4.1 representa, de forma simplificada, o processo geral de hidrólise ácida da celulose e hemicelulose.

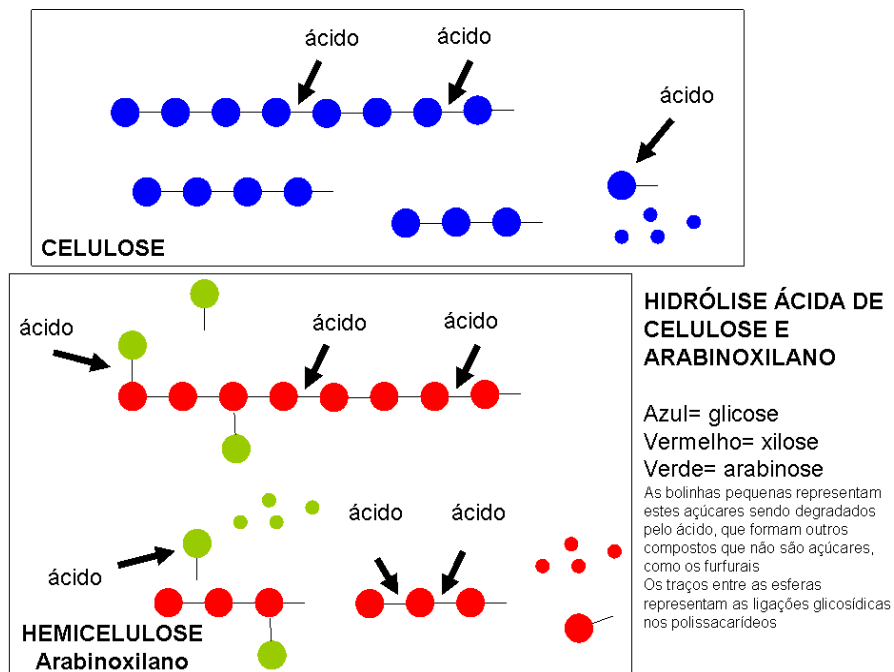


Figura 4.1 - Diagrama da hidrólise ácida (BUCKERIDGE et al., 2010).

Observando-se a figura anterior percebe-se que após os açúcares serem obtidos é possível que estes sejam atacados pelo ácido presente no meio reacional, ocorrendo a produção de compostos inibitórios.

Devido à formação dessas substâncias indesejadas, métodos de destoxificação devem ser empregados após a realização da hidrólise ácida, o que contribui com o aumento da dificuldade e dos custos de sua operação (MARTON, 2002 apud SILVA, 2015).

Conforme já mencionado, a hidrólise ácida pode ser realizada com ácido concentrado ou diluído, sendo que ambas as formas apresentam peculiaridades a serem observadas antes da seleção das condições operacionais desta etapa. O uso de ácidos concentrados resulta em um maior rendimento na quebra das moléculas de celulose, mas em contrapartida, exige que os equipamentos utilizados sejam resistentes à corrosão, o que aumenta os custos do processo. Já o emprego de ácidos diluídos, apesar de reduzir os custos de aquisição de equipamentos, apresenta, originalmente, a quebra da celulose lenta, sendo necessárias maiores temperaturas para aumentar a velocidade da hidrólise e, desta forma, torná-lo mais rápido do que o processo que usa ácido concentrado, mas isto representa um problema, visto que temperaturas elevadas levam à maior degradação dos açúcares formados e da lignina residual e, conseqüentemente, à maior formação de inibidores (ASSUMPCÃO, 2015).

As diversas pesquisas existentes possuem maior interesse na hidrólise ácida com ácido diluído (concentração de ácido menor que 5% m/v), pois trata-se de um procedimento economicamente mais viável para a produção de etanol de segunda geração, o que é devido ao menor consumo de ácido, responsável por reduzir os custos com matéria-prima e também com compra de equipamentos, que não precisam apresentar grande resistência à corrosão (GURGEL, 2010).

Outra vantagem do processo com ácido diluído é que este facilita o emprego de processos contínuos, pois em razão do uso de temperatura e pressão mais elevadas, apresenta tempos de reação curtos, da ordem de segundos a alguns minutos (GRAF; KOEHLER, 2000 apud BNDES; CGEE, 2008).

Devido à presença de hemicelulose e celulose no meio reacional, a hidrólise ácida é feita em duas etapas (JARDINE et al., 2009). A primeira delas, como tem o intuito de recuperar apenas as pentoses da hemicelulose, a qual sofre hidrólise mais facilmente, é realizada sob as condições operacionais do próprio pré-tratamento ácido, com temperatura entre 100 e 120 °C. Já a segunda etapa é submetida a condições operacionais mais intensas, visto que visa recuperar as hexoses, dentre elas a glicose presente na estrutura da celulose, que possui hidrólise mais difícil (BNDES; CGEE, 2008; BUCKERIDGE, 1990 apud BUCKERIDGE et al., 2010). Tal fato resulta, inclusive, em menores rendimentos de recuperação da glicose. Por exemplo, para manose, galactose e glicose, os rendimentos obtidos são, aproximadamente, de 89%, 82% e 50%, respectivamente, o que evidencia o fato

de que a glicose é recuperada em menor quantidade (HAMELINCK et al., 2005 apud BERNARDO NETO, 2009).

A Figura 4.2 representa de forma esquemática a realização da hidrólise com ácido diluído.

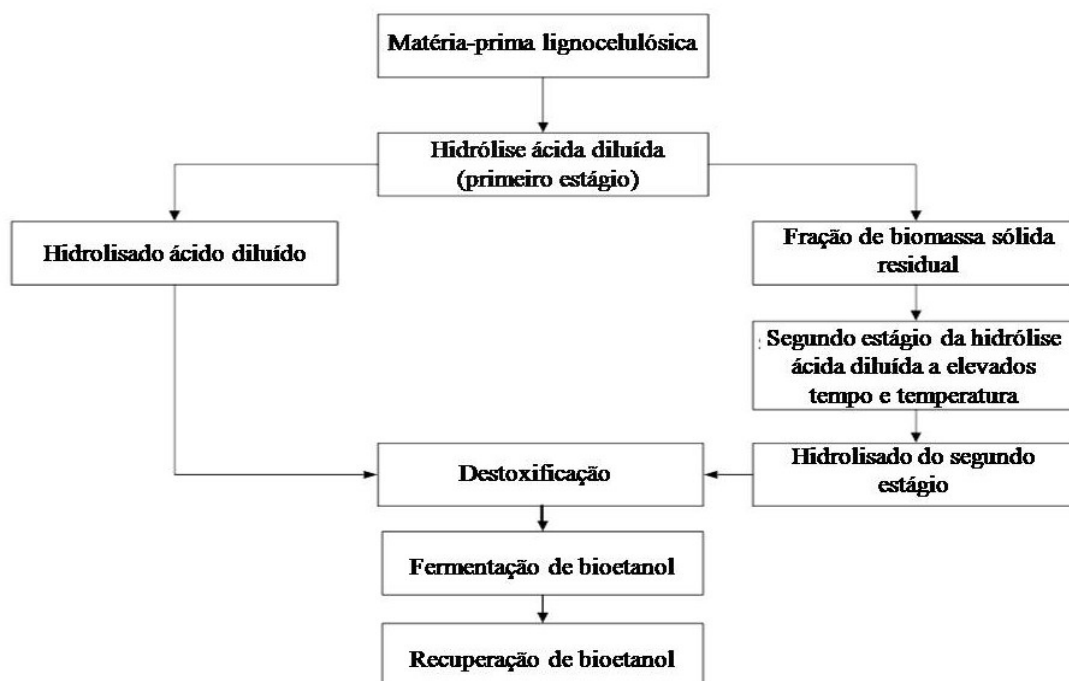


Figura 4.2 - Hidrólise ácida diluída (primeiro e segundo estágios) e fermentação separada de açúcares pentose e hexose (CHANDEL et al., 2007 apud BALAT et al., 2008).

Neste caso, o hidrolisado do primeiro estágio e o do segundo estágio são fermentados juntos, mas é possível que ocorra a fermentação separada destes produtos.

#### 4.1.1 - Produção de compostos inibitórios

Uma significativa desvantagem da hidrólise ácida, conforme visto na Figura 4.1, é que durante a sua realização pode ocorrer a formação de muitos subprodutos, advindos da degradação dos açúcares formados ou da lignina e que dificultam a bioconversão dos açúcares em etanol, pois possuem a capacidade de inibir a atuação microbiana. Vale ressaltar que esses compostos inibitórios também podem ser originados durante o pré-tratamento, dependendo do material lignocelulósico usado e da metodologia empregada (CANILHA et al., 2010; CARDONA et al., 2010 apud FERREIRA, 2016).

Os principais inibidores encontrados no meio reacional após a realização da hidrólise ácida são: ácido acético, furfural, 5-hidroxi metilfurfural e compostos fenólicos (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994; MARTÍN et al., 2007 apud SILVA, 2015). A formação destes compostos encontra-se representada na Figura 4.3, na qual é possível observar a origem de cada inibidor produzido durante a hidrólise.

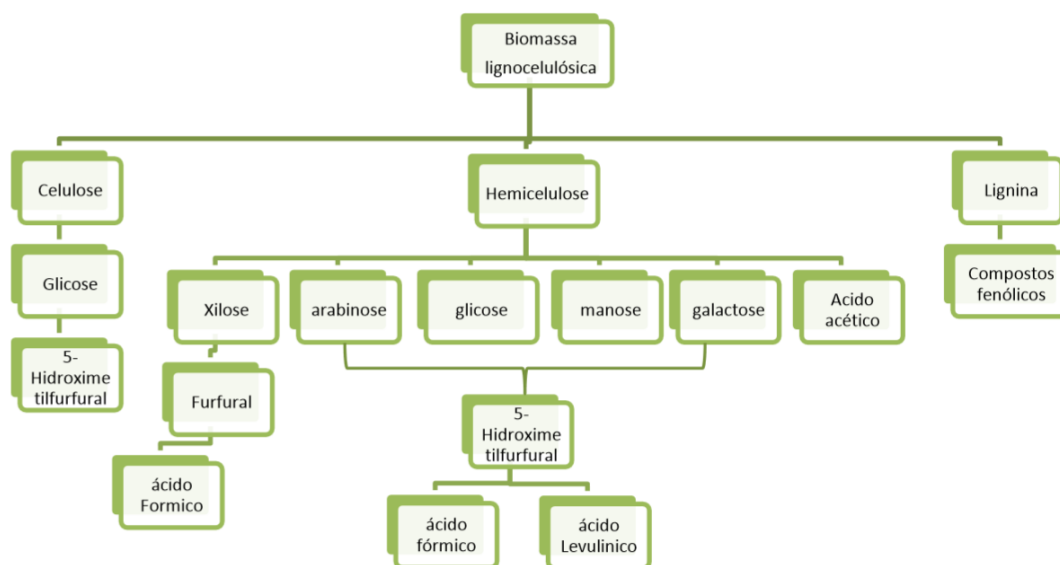


Figura 4.3 - Formação de compostos inibitórios da hidrólise e fermentação (Adaptado de PALMQVIST et al., 1999 apud SILVA, 2015).

#### 4.1.1.1 - Destoxificação do hidrolisado

Várias metodologias, baseadas em princípios químicos, físicos e biológicos, têm sido empregadas na destoxificação do hidrolisado lignocelulósico, o que favorece a etapa posterior de fermentação (ALVES et al., 1998; CARVALHO et al., 2005; MARTON, 2002; ROBERTO et al., 1991; SILVA et al., 2006 apud ARRUDA, 2008). De acordo com BONOMI (2010), os procedimentos existentes são os mais diversos possíveis, incluindo o uso de microrganismos, extração com solvente, tratamentos com hidróxidos alcalino-terrosos, evaporação e destilação, adsorção em carvão ativo e carvão vegetal, emprego de resinas de troca iônica, emprego de lignina residual como adsorvente e aplicação de zeólitos.

A seleção do método de destoxificação depende basicamente de dois fatores, o tipo de hidrolisado a ser destoxificado, pois a eficiência dos métodos varia de acordo com o material processado, e o microrganismo empregado na fermentação, para que sejam verificados quais compostos possuem potencial inibitório com relação ao mesmo, sendo

retiradas apenas as substâncias que realmente são inibidoras (CHANDEL et al., 2011; OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996 apud FERREIRA, 2016).

Tem-se como exemplos específicos de métodos usados: a alteração de pH com adição de ácidos e bases, a alteração de pH em conjunto com a adsorção em carvão vegetal ativado, a adsorção em carvão vegetal e o uso em paralelo de resinas de troca iônica e ainda a floculação pela aplicação de polímeros vegetais (ALVES et al., 1998; CARVALHO et al., 2005; MARTON, 2002; ROBERTO et al., 1991; SILVA et al., 2006 apud ARRUDA, 2008).

Destes, o método de adição de bases, como por exemplo, hidróxido de cálcio, conhecido como técnica de *overliming*, é considerado o mais empregado, pois permite a remoção parcial de inibidores como furfural e 5-hidroximetilfurfural e a retirada de compostos ácidos do meio na forma de precipitados, como sulfato de cálcio, promovendo, conseqüentemente, o ajuste de pH do hidrolisado (CARDONA et al., 2010; CHANDEL et al., 2011; DU PREEZ, 1994a; OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; ROBERTO, 1994 apud FERREIRA, 2016). Além disso, a técnica de *overliming* resulta na separação de compostos fenólicos, precipitação de metais pesados e conversão de furfural em álcool furfurílico ou ácido furóico (PARAJÓ et al., 1998b apud FERREIRA, 2016).

Entretanto, existem duas desvantagens significativas desta metodologia, a primeira é que não é possível retirar o ácido acético do hidrolisado e a segunda é que ocorrem perdas dos açúcares fermentescíveis devido às reações de degradação, catalisadas pelo hidróxido empregado (CARVALHO et al., 2005; KARIMI et al., 2006 apud FERREIRA, 2016).

Outro método muito usado é a adsorção por carvão vegetal ativado, cujo princípio consiste na capacidade da superfície porosa do carvão de reter os compostos inibitórios por meio de forças intermoleculares de Van Der Waals. A eficiência da adsorção depende das condições sobre as quais é realizada, ou seja, pH, temperatura, concentração do carvão, tempo de contato, etc. (COSIDINE, 1974; MARTON, 2002 apud SILVA, 2015). Sua vantagem, quando comparada com a técnica de *overliming*, é que permite a redução da concentração de ácido acético no hidrolisado (CARDONA et al., 2010; PARAJÓ et al., 1998b apud FERREIRA, 2016).

Já a técnica de destoxificação biológica, mais conhecida como biodestoxificação, tem sido cada vez mais empregada, isto porque esse método baseia-se no uso direto de microrganismos ou de enzimas produzidas por eles, de forma que seja possível metabolizar todos ou pelo menos grande parte dos subprodutos com caráter inibitório. Os microrganismos mais utilizados são fungos filamentosos, leveduras e bactérias (FONSECA, 2009). Pode-se



citar como exemplo, o uso de micélios de *Trichoderma reesei*, enzimas (lacase e peroxidase) produzidas por fungos lignolíticos e ainda a aplicação de enzimas obtidas de *Trametes versicolor*, que permitem a eliminação completa e seletiva de monômeros fenólicos observados no hidrolisado (BONOMI, 2010).

#### 4.2 - Hidrólise enzimática

Conforme mencionado anteriormente, a hidrólise enzimática utiliza enzimas de atuação específica como catalisador da reação de quebra das moléculas dos polissacarídeos em monossacarídeos. As enzimas que hidrolisam a celulose são chamadas genericamente de celulases (VÁSQUEZ, 2007).

Além destas, existem também as enzimas que hidrolisam a fração hemicelulósica da biomassa, sendo elas as xilanases, mananases, glucanases e galactanases, e as enzimas oxidativas que agem sobre a lignina, englobando a peroxidase, manganês peroxidase e lacase, definidas como fenoloxidasas (TUOR et al., 1995; WOOD; GARCIA-CAMPAYO, 1990 apud SILVA, 2012).

Pode-se citar como exemplo de produtores de celulases e hemicelulases os fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo o *Trichoderma reesei* o mais usado em escala industrial. Tal produção é feita por meio de fermentação submersa sob condições adequadas (SHEN; XIA, 2004; WYMAN, 2003 apud SUAREZ, 2014). Também pode-se usar leveduras, como é o caso das leveduras do gênero *Trichosporium sp*, que produzem tanto celulases quanto xilanases (STEVENS; PAYNE, 1977 apud SILVA, 2012).

Com relação às etapas envolvidas na hidrólise enzimática da celulose, pode-se resumi-las basicamente da seguinte forma (AWAFO, 1997; KLYOSOV, 1995a; KLYOSOV, 1995b; RAD; YAZDANPARAST, 1998 apud VÁSQUEZ, 2007):

1. Difusão das celulases para o substrato;
2. Adsorção do complexo celulásico nos sítios ativos do substrato;
3. Formação de um complexo ativo entre as enzimas e o substrato;
4. Hidrólise das ligações glicosídicas existentes entre os monossacarídeos;
5. Difusão dos produtos da hidrólise do complexo ativo para o meio líquido;
6. Dessorção do complexo celulásico do substrato hidrolisado.

Durante a realização da hidrólise enzimática da celulose deve-se atentar aos fatores que influenciam a eficiência do processo, sendo eles a própria atividade da enzima e as condições de reação, ou seja, temperatura, pressão e pH. Além disso, as características estruturais do substrato também são importantes, como por exemplo, o grau de polimerização, cristalinidade e área de superfície da celulose (McMILLAN, 1994 apud BORTOLAZZO, 2011). A Tabela 4.2 apresenta os resultados da hidrólise enzimática de alguns materiais lignocelulósicos, submetidos a diferentes condições de pré-tratamento.

Tabela 4.2 - Resultados da hidrólise enzimática de alguns materiais lignocelulósicos (LINDE et al., 2008; ÖHGREN et al., 2005; SANDELIUS, 2005; SASSNER et al., 2005; SASSNER et al., 2007 apud GALBE; ZACCHI, 2010).

	<b>Salgueiro</b>			<b>Palha de trigo</b>	<b>Resíduo de milho</b>	<b>Bagaço de cana-de-açúcar</b>
Condições de pré-tratamento	200 °C, 8 min, 0,5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	205 °C, 4 min, 2,5% SO <sub>2</sub>	210 °C, 14 min, sem catalisador	190 °C, 10 min, 0,2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	190 °C, 5 min, 2,5% SO <sub>2</sub>	190 °C, 5 min, 2,0% SO <sub>2</sub>
Glicose na fase líquida após pré-tratamento	5,2 g (11,2%)	8,4 g (18,3%)	1,8 g (4,0%)	1,8 g (4,7%)	5,8 g (14,0%)	2,3 g (4,7%)
Glicose na hidrólise enzimática	37,4 g (81,3%)	34,1 g (74,0%)	40,1 g (87,2%)	37,6 g (95,7%)	29,8 g (72,9%)	42,0 g (87,2%)
Xilose na fase líquida após pré-tratamento	11,6 g (68%)	10,4 g (61%)	3,4 g (20,0%)	17,1 g (75,0%)	14,7 g (58,6%)	13,0 g (47,1%)
Xilose na hidrólise enzimática	1,0 g (5,8%)	1,1 g (6,5%)	1,7 g (10%)	4,6 g (20,2%)	4,9 g (19,3%)	1,1 g (4,0%)
Rendimento global (glicose + xilose)	55,2 g (87,5%)	54,0 g (85,6%)	47,0 g (74,6%)	61,1 g (98,2%)	55,2 g (83,6%)	58,4 g (77,1%)

Importante destacar que as quantidades de açúcar obtidas e expressas na tabela anterior são relativas ao uso de 100 g de matéria-prima, que as condições de pré-tratamento foram selecionadas de forma a garantirem rendimento máximo em glicose e que a hidrólise enzimática foi realizada em condições padrão (2% WIS, 40 °C, 15 FPU/g WIS, 96 h). As porcentagens mostradas entre parênteses referem-se exatamente às porcentagens do rendimento real com relação ao teórico (LINDE et al., 2008; ÖHGREN et al., 2005; SANDELIUS, 2005; SASSNER et al., 2005; SASSNER et al., 2007 apud GALBE; ZACCHI, 2010).

Observando-se as informações disponibilizadas, percebe-se a importância da hidrólise enzimática para a produção de etanol de segunda geração quando esta é empregada, pois apenas após a sua realização é que quantidades significativas de glicose foram alcançadas. Já com relação à xilose, esta é obtida majoritariamente durante o próprio pré-tratamento, o que está associado à maior facilidade da hemicelulose em sofrer o processo de hidrólise.

Outro fator que influencia o rendimento da hidrólise enzimática é a presença de lignina no material a ser hidrolisado, pois uma vez no meio reacional além de impedir o acesso das celulasas à celulose, ainda pode formar ligações irreversíveis com as enzimas. Tal comportamento torna a sua remoção prévia um procedimento necessário (McMILLAN, 1994 apud BORTOLAZZO, 2011).

Com base no potencial deste mecanismo de hidrólise, bioprocessamentos têm sido cada vez mais desenvolvidos, como é o caso da empresa de pesquisa em biocombustíveis Mascoma Corporation, que criou um processo no qual em uma única etapa e com o uso do mesmo microrganismo as celulasas são produzidas e a fermentação ocorre (OGEDA; PETRI, 2010).

#### **4.2.1 - Celulasas**

De forma geral, o complexo celulásico é constituído por três grupos de enzimas: as exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases, que caracterizam-se por hidrolisarem a celulose a partir de suas extremidades, liberando principalmente celobiose e glicose, as endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases, que hidrolisam a celulose nas suas regiões internas e geralmente produzem, de forma aleatória, oligômeros constituídos por até seis moléculas de glicose, e as 1,4- $\beta$ -D-glucosidases, que promovem a hidrólise da celobiose em glicose (PEREIRA, 2013; LYND et al., 2002 apud VÁSQUEZ, 2007).

Portanto, o processo de hidrólise inicia-se com a atuação das endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases, que promovem a clivagem da celulose em suas regiões amorfas, produzindo oligossacarídeos de menor peso molecular, o que reduz seu grau de polimerização e cria novas extremidades de cadeia, com terminais redutores e não redutores. Em seguida, as exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases (celobiohidrolases e glucanohidrolases) atuam na região cristalina da celulose, por meio das novas extremidades geradas, liberando celobiose ou glicose. Por fim, as 1,4- $\beta$ -D-glucosidases hidrolisam a celobiose e as celodextrinas presentes no meio, originando glicose (AGUIAR et al., 2008 apud SANTOS, 2014; MUÑOZ et al., 2001 apud MENDES, 2010).

Grande parte das enzimas celulases de fungos e todas as enzimas produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei* apresentam estrutura constituída por dois domínios funcionais diferentes, o domínio catalítico e o domínio que possibilita a ocorrência da ligação entre enzima e substrato, chamado de *Core Binding Domain*. Os dois domínios enzimáticos, por sua vez, ligam-se entre si por meio de uma região glicosídica (SALOHEIMO et al., 1997; SRISODSUK, 1994 apud CARVALHO, 2011). A Figura 4.4 mostra a estrutura típica da maioria das enzimas celulases.

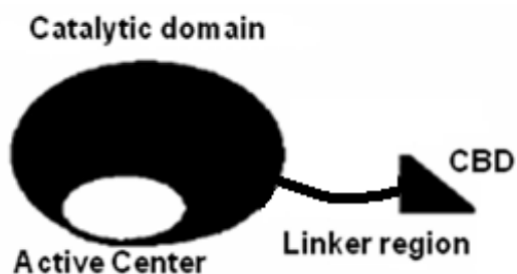


Figura 4.4 - Representação esquemática da maioria das enzimas celulases (BANSAL et al., 2009 apud CARVALHO, 2011).

A Figura 4.5 mostra a atuação conjunta das celulases para que a hidrólise da celulose em glicose seja possível.

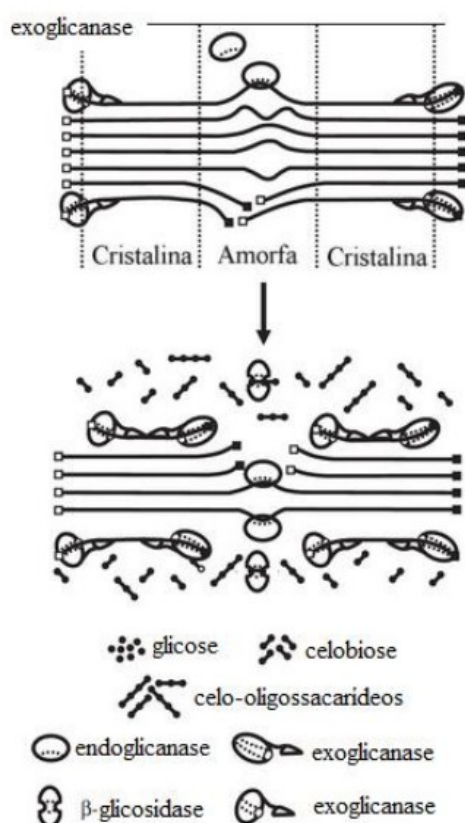


Figura 4.5 - Hidrólise da celulose pela ação das celulases (LYND et al., 2002 apud SUAREZ, 2014).

Na figura acima os quadrados em branco representam os terminais não redutores e os preenchidos, os terminais redutores (LYND et al., 2002 apud SUAREZ, 2014).

#### 4.2.2 - Hemicelulases

O uso de enzimas hemicelulases durante a hidrólise enzimática tem representado um fator importante, isto porque tais enzimas são capazes de facilitar a hidrólise da celulose, expondo as suas microfibrilas às celulases, promover a hidrólise de xilanas remanescentes no meio e não associadas à lignina residual e ainda hidrolisar os grupos laterais da hemicelulose que encontra-se ligada à lignina residual, aumentando, assim, a porosidade da parede celular (HMMEL et al., 2007; NGUYEN et al., 2008 apud MENDES, 2010).

Outra justificativa para a adição de hemicelulases no meio reacional, mais especificamente enzimas xilanases, produzidas, por exemplo, pelo fungo *Thermomyces lanuginosus*, é o fato dos xilo-oligômeros advindos da hemicelulose representarem potenciais inibidores da hidrólise enzimática. A atuação das xilanases consiste em hidrolisar tais compostos em xiloses, que também inibem a hidrólise enzimática, mas em menor intensidade,

umentando, portanto, a eficiência do processo (MAEDA et al., 2011 apud ARAÚJO et al., 2013).

Como a hemicelulose apresenta uma estrutura com grande heterogeneidade, sua hidrólise exige o uso de um conjunto de enzimas (MENDES, 2010). Destas, destacam-se as endo-enzimas, responsáveis por agirem na parte interna das cadeias principais, e as exo-enzimas, que atuam sobre os oligossacarídeos, produzindo monossacarídeos (KALOGERIS et al., 2001 apud BRIENZO, 2010).

As endo- $\beta$ -1,4-D-xilanases hidrolisam internamente as xilanas, originando xilo-oligossacarídeos de baixo grau de polimerização. Tais produtos funcionam como substrato para as enzimas exo- $\beta$ -1,4-D-xilanases, que atuam no terminal redutor e produzem D-xilose. Já as enzimas arabinofuranosidades agem nas ramificações das xilanas, liberando para o meio arabinose, as  $\alpha$ -glucuronidases removem os ácidos glucurônicos e, por fim, as acetil-xilana esterases removem os grupos acetil (BEG et al., 2001; JUHÁSZ et al., 2005; WONG et al., 1988 apud BRIENZO, 2010).

A ação dessas enzimas é extremamente importante, pois permite a conversão de compostos inibitórios (xilo-oligossacarídeos e xilobiose) em açúcares fermentescíveis (BASTAWDE, 1992; COLLINS, 2005; SAHA, 2003a apud MENDES, 2010).

A hidrólise enzimática da hemicelulose encontra-se representada, de forma simplificada, na Figura 4.6.

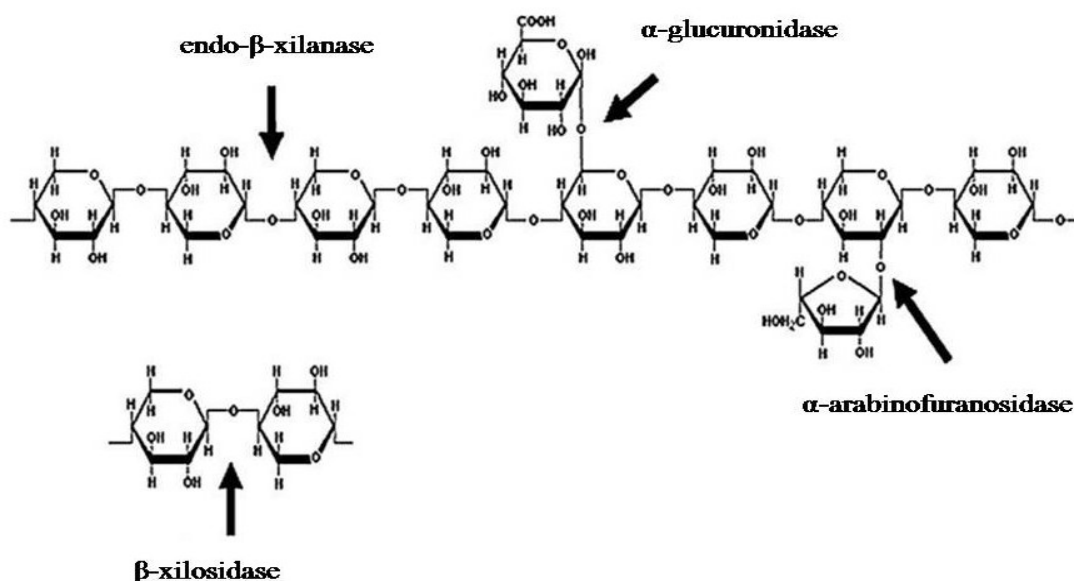


Figura 4.6 - Pontos de ação das enzimas hidrolíticas que atuam na hidrólise da hemicelulose (KUMAR, 2008 apud MENDES, 2010).

### 4.2.3 - Inibição enzimática

Um problema relacionado à atuação das celulases é que conforme estas hidrolisam a celulose e as concentrações de celobiose e glicose aumentam, estes produtos passam a inibir a atividade enzimática e ocorre uma redução na taxa e no rendimento da sacarificação. As endoglucanases e as exoglucanases possuem sua atividade reduzida pela presença de celobiose no meio e as glucosidases são inibidas pela presença de glicose (GAN et al., 2004; KASTEL'YANOS et al., 1995; ZHANG; LYND, 2004 apud CARVALHO, 2011).

Além da inibição devido aos próprios produtos da hidrólise enzimática, as enzimas celulases também podem ter a sua atividade reduzida em razão da adsorção destas pela lignina que eventualmente encontrar-se no substrato, como visto anteriormente, ou da desnaturação pelo efeito de tempo, temperatura e agitação (SHULER; KARGI,1992 apud PEREIRA, 2013).

A Figura 4.7 apresenta alguns fatores potencialmente limitantes da ação das celulases.

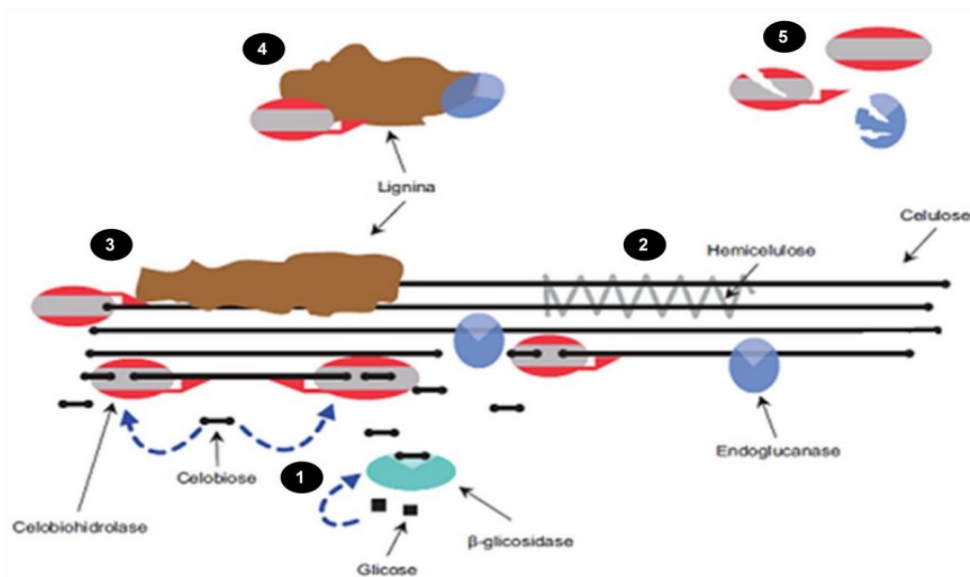


Figura 4.7 - Alguns fatores limitantes da hidrólise enzimática (JØRGENSEN et al., 2007 apud WOLF, 2011).

Na qual, tais fatores são (JØRGENSEN et al., 2007; MOSIER et al., 2005 apud WOLF, 2011):

1. Inibição das exoglucanases (celobiohidrolases) e das  $\beta$ -glicosidades pelos seus respectivos produtos, celbiose e glicose;
2. Impedimento estérico das celulases à celulose pela hemicelulose;
3. Impedimento estérico das celulases à celulose pela lignina;
4. Adsorção das celulases pela lignina;
5. Redução da atividade das celulases devido à desnaturação térmica, efeito de agitação e produtos de degradação advindos de pré-tratamentos drásticos.

### **4.3 - Comparação entre a hidrólise ácida e a enzimática**

A hidrólise enzimática possui algumas vantagens quando comparada à hidrólise ácida, como por exemplo a sua operação, que dá-se sob pressão ambiente e temperatura moderada, entre 50 e 60 °C, apresenta maiores rendimentos e possibilita a aplicação de técnicas avançadas de biotecnologia para sua otimização (RODRIGUES, 2009 apud SILVA, 2012).

Também é interessante destacar que como as enzimas possuem atuação muito específica com relação ao substrato, a formação de compostos indesejados durante a reação de hidrólise é reduzida, o que resulta em uma diminuição dos custos com tratamentos para remoção dos subprodutos inibitórios da hidrólise ou da fermentação e ainda aumenta a eficiência destas etapas (SUAREZ, 2014).

Outro problema da hidrólise ácida e que é eliminado com o uso de enzimas como catalisadores na hidrólise do material lignocelulósico é que o hidrolisado deve ser neutralizado antes da realização do processo fermentativo. Geralmente, a neutralização é feita com hidróxido de cálcio, que uma vez separado não pode ser reaproveitado, elevando o custo da técnica. Desta forma, para que níveis de comercialização favoráveis sejam alcançados, deve-se reduzir os custos com o consumo e a reutilização do ácido e também melhorar a produtividade e eficiência na conversão da biomassa (ALI et al., 2006; GOLDEMBERG, 2007; KAYLEN et al., 2000 apud BUCKERIDGE et al., 2010).

Em contrapartida, uma característica positiva da hidrólise ácida é que os ácidos podem penetrar na estrutura de lignina existente e promover a hidrólise da celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis mesmo que nenhum pré-tratamento para separar os componentes do material lignocelulósico tenha sido realizado anteriormente, o que é impossível na hidrólise enzimática (GALBE; ZACCHI, 2002 apud VERARDI et al., 2012). Além disso, uma grande limitação da aplicação da hidrólise enzimática industrialmente é o



alto custo associado às enzimas empregadas no processo, seja em razão da sua compra ou produção (RODRIGUES, 2009 apud SILVA, 2012). Outro ponto negativo do uso de enzimas é o tempo de reação, que ainda mostra-se bastante elevado (FELIPE; ROSSELL, 2010).

O Quadro 4.1 mostra um resumo das principais informações discutidas anteriormente (KRISHNA et al., 2000 apud PEREIRA, 2013).

Quadro 4.1 - Comparação entre a hidrólise ácida e enzimática de acordo com critérios de pré-tratamento, taxa de hidrólise, temperatura, pressão, rendimento e formação de subprodutos (KRISHNA et al., 2000 apud PEREIRA, 2013).

<b>Parâmetro</b>	<b>Hidrólise ácida</b>	<b>Hidrólise enzimática</b>
Pré-tratamento	Pode ser necessário	Necessário
Taxa de hidrólise	Rápida (min)	Lenta (h)
Temperatura	Alta (200 °C)	Baixa (45 °C)
Pressão	Alta	Atmosférica
Rendimento	Depende do material e do processo	Depende do material e do processo
Formação de subprodutos	Provável formação	Não há formação

Observando-se o conteúdo da tabela acima, pode-se concluir que a hidrólise enzimática, de forma geral, é superior à hidrólise ácida na maioria dos aspectos (KRISHNA et al., 2000 apud PEREIRA, 2013). Entretanto, mesmo com todas essas vantagens, é importante salientar que a seleção do método de hidrólise a ser aplicado no processo produtivo é um ponto definitivo para a viabilidade econômica da produção do etanol de segunda geração e, portanto, exige avaliação detalhada de uma série de fatores operacionais, garantindo a adoção da técnica mais adequada.

## CAPÍTULO 5

### FERMENTAÇÃO DO MATERIAL HIDROLISADO

#### 5.1 - Aspectos gerais da fermentação alcoólica

A fermentação consiste em um procedimento que visa produzir etanol a partir dos açúcares diretamente fermentescíveis presentes no meio reacional. Entretanto, por tratar-se de um processo complexo, resulta na transformação dos carboidratos não apenas em etanol, mas também em outras substâncias, como gás carbônico, ácido succínico, ácidos voláteis, ésteres, etc. (LEHNINGER et al., 2000 apud PEREIRA, 2013).

Caracteriza-se por ser uma etapa estritamente biológica, pois a produção do etanol a partir dos açúcares redutores ocorre via catálise de enzimas produzidas por microrganismos específicos. Estes, por sua vez, precisam atender a diferentes critérios, por exemplo, apresentar elevada taxa de fermentação e tolerância a compostos inibitórios e à elevadas temperaturas, de forma que tenha-se uma fermentação alcoólica com a maior eficiência possível (ASSUMPÇÃO, 2015).

Quanto às condições operacionais, temperatura, qualidade da matéria-prima e pH são os fatores que mais influenciam no rendimento da fermentação (ASSUMPÇÃO, 2015). Este último tem influência direta na eficiência dessa etapa, pois afeta o crescimento dos microrganismos fermentadores, e deve estar na faixa de 4,5 a 5, no caso do emprego de leveduras (NUNES et al., 2013).

Portanto, para que a fermentação apresente resultados satisfatórios, deve-se criteriosamente preparar o mosto, líquido açucarado a ser usado no processo, focando-se principalmente na concentração adequada de açúcares totais, na relação destes com os sólidos solúveis no meio, acidez total e pH (NUNES et al., 2013). Além disso, é possível que a suplementação do mosto com nutrientes seja necessária (ALCARDE, 2005 apud NUNES et al., 2013).

Outro ponto importante para os processos fermentativos é a produção do inóculo de microrganismos que será empregado, visto que as células a serem inoculadas no meio reacional precisam apresentar estado fisiológico adequado para serem capazes de metabolizar os carboidratos e produzir etanol. Tal procedimento consiste em preparar uma população de

microrganismos a partir de uma cultura previamente obtida e armazenada como estoque (WOLF, 2011).

Além disso, deve-se levar em conta os fatores de assepsia e manutenção dos equipamentos empregados. Neste sentido, de acordo com MARTINS (2009), a maioria das indústrias utilizam-se de processo do tipo batelada alimentada, com recirculação e posterior tratamento da levedura, pois esta configuração permite que ao final de cada batelada a dorna seja esvaziada e sua limpeza e possíveis manutenções sejam executadas, sendo, posteriormente, iniciado um novo ciclo com segurança.

Outro fator que torna a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos ainda mais complexa é a produção de diversos compostos inibitórios, devido à degradação da matéria-prima lignocelulósica, durante o pré-tratamento (em razão da maioria dos métodos envolver o uso de altas temperaturas e condições ácidas drásticas) e a hidrólise ácida, quando esta é empregada, que se não removidos por meio de processos de destoxificação, irão prejudicar a eficiência da fermentação (JARDINE et al., 2009).

Pode-se citar, por exemplo, os efeitos negativos resultantes da presença de furfural e hidroximetilfurfural, os quais encontram-se associados à degradação de açúcares como xilose e glicose: diminuição da taxa específica de crescimento dos microrganismos, redução da quantidade de etanol produzido e diminuição da síntese de biomassa. Já os compostos aromáticos, originários da degradação da lignina, são extremamente tóxicos para os microrganismos, causando danos diretos na sua membrana plasmática (PALMQVIST; HAHN-HÅGERDAL, 2000; ROSSEL, 2006 apud WOLF, 2011).

## 5.2 - Microrganismos produtores de etanol

Vale ressaltar que a fermentação é executada majoritariamente de forma anaeróbia e que os microrganismos empregados são usualmente leveduras, que incluem desde leveduras de panificação, prensadas e secas até mesmo leveduras selecionadas, com tolerância a maiores concentrações de etanol e com taxas de fermentação mais significativas. Destas, a mais empregada é a *Saccharomyces cerevisiae* (ANEEL, 2005; BELLUCO, 2001 apud WOLF, 2011). Entretanto, as maiores produtoras de etanol são as leveduras do gênero *Candida*, podendo-se citar a *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. mogii* (CASSALES, 2010 apud FURLAN, 2015).

Mesmo assim, o microrganismo mais apropriado para promover a fermentação alcoólica tradicional em escala industrial é a *Saccharomyces cerevisiae*, pois devido à sua

grande aplicação nesse processo produtivo, passou por uma seleção natural ao longo do tempo que garantiu-lhe características como significativo desempenho em termos de produção de etanol, produtividade e tolerância à inibição em razão da presença de álcool no meio reacional (RABELO, 2010).

Também é possível o uso de bactérias, principalmente as da espécie *Zymomonas mobilis*, que são as que apresentam o maior potencial para produção de etanol em escala industrial, podendo este processo ocorrer a partir de açúcares, xarope, caldo de cana ou outros substratos (LEE; HUANG, 2000 apud SANTOS, 2012).

O metabolismo das *Zymomonas mobilis* baseia-se no fato de que elas são microrganismos quimiorganotróficos, o que significa que processam matéria orgânica, por exemplo glicose, frutose e sacarose, para produzirem substâncias usadas em seu desenvolvimento. A partir da metabolização desses açúcares, há a produção de etanol e CO<sub>2</sub>, aproximadamente em quantidades equimolares. Entretanto, mesmo diferentes carboidratos sendo indispensáveis na composição do meio de cultura de *Zymomonas mobilis*, é com o processamento da glicose que obtém-se os melhores resultados de produção de etanol (CAMÊLO, 2009 apud SANTOS, 2012). Para produção de etanol o pH ótimo desses microrganismos varia entre 4,5 e 7 em temperaturas de 30 a 35 °C (ERNANDES et al., 2009 apud FURLAN, 2015).

Porém, como após a fermentação as indústrias reaproveitam o microrganismo empregado para a realização de novas fermentações e isto exige a execução de um tratamento antes, que na maioria das vezes é feito com ácidos e estes resultam em uma redução brusca do pH, o uso de bactérias fica limitado, pois podem não resistir e, por consequência, serem perdidas. Isto representa uma desvantagem do emprego de *Zymomonas mobilis* (FURLAN, 2015).

### **5.2.1 - Microrganismos produtores de etanol a partir de pentoses**

Conforme visto anteriormente, a partir dos materiais lignocelulósicos são obtidos açúcares com seis átomos de carbono (hexoses), originários tanto da fração celulósica quanto da hemicelulósica da biomassa, e com cinco (pentoses), originários apenas da fração hemicelulósica. Com relação às hexoses, estas são fermentadas anaerobicamente de forma eficiente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cuja tecnologia já encontra-se bem consolidada (ASSUMPCÃO, 2015). Porém, as linhagens comuns dessa levedura não possuem a capacidade nem de assimilar nem de fermentar as pentoses, por exemplo a xilose, que

representa o principal constituinte da hemicelulose, o que está associado ao fato de que as pentoses possuem um procedimento metabólico diferente das hexoses (BASSO et al., 2008; EMBRAPA, 2013 apud PEREIRA, 2013).

Em razão dessa peculiaridade, as linhas de pesquisa em desenvolvimento focam-se em dois caminhos diferentes, a seleção e melhoramento de microrganismos que possuem naturalmente a capacidade de fermentar as pentoses e o desenvolvimento de linhagens recombinantes de microrganismos que originalmente fermentam apenas as hexoses (JARDINE et al., 2009).

Neste sentido, estudos têm sido realizados com gêneros de microrganismos que já são conhecidos pelo seu potencial como produtores de etanol para verificar sua capacidade de produzirem etanol a partir de matéria-prima lignocelulósica. Esses microrganismos incluem leveduras, dos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pachysolen* e *Spathaspora*; fungos filamentosos, dos gêneros *Fusarium*, *Mucor*, *Monilia* e *Paecilomyces*; e bactérias, dos gêneros *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteróides*, *Thermoanaerobacter*, *Klebsiella*, *Cellulomonas* e *Zymomonas* (CADETE et al., 2009; ERNANDES, 2009; SILVA, 2007 apud FURLAN, 2015).

O Quadro 5.1 mostra as principais leveduras fermentadoras de pentoses. A maioria delas pertence aos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pachysolen* e *Spathaspora*, mas também observa-se a presença de alguns outros gêneros.

Quadro 5.1 - Alguns exemplos de leveduras fermentadoras de pentoses (Adaptado de PEREIRA, 2011 apud SILVA, 2015).

Leveduras	Referência
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	YU et al., 2015
<i>Rhodotorula glutinis</i>	ROVIERO et al., 2015
<i>Candida tropicalis</i>	CHENG et al., 2014
<i>Scheffersomyces shehatae</i>	ANTUNES et al. 2014
<i>Candida intermedia</i>	KALHORINIA et al., 2014
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MARTINI, 2014
<i>Spathaspora roraimanensis</i>	MOURO, 2012
<i>Spathaspora suhii</i>	MOURO, 2012
<i>Candida xilofermentans</i>	MOURO, 2012
<i>Spathaspora arborariae</i>	Da CUNHA-PEREIRA et al., 2011
<i>Candida guilliermondii</i>	ARRUDA & FELIPE, 2009
<i>Pachysolen tannophilus</i>	CHENG et al., 2008
<i>Spathaspora passalidarum</i>	NGUYEN et al., 2006
<i>Candida blankii</i>	PETRUS, 1991
<i>Candida tenuis</i>	TOIVOLA, 1984
<i>Brettanomyces naardenensis</i>	TOIVOLA, 1984
<i>Pichia segobiensis</i>	TOIVOLA, 1984
<i>Kluyveromyces cellobivorus</i>	WALKER, 1998
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	WALKER, 1998
<i>Debaryomyces polimorpha</i>	WALKER, 1998
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	GONG et al., 1983

O Quadro 5.2, por sua vez, mostra mais algumas leveduras que apresentam potencial para serem empregadas em processos fermentativos de pentoses e suas principais características. Destas, existem aquelas que possuem capacidade natural de fermentarem pentoses e as que adquiriram tal característica após submissão das mesmas a modificações genéticas, como é o caso da *Saccharomyces cerevisiae* recombinante.

Quadro 5.2 - Exemplos de Leveduras fermentadoras de pentoses e suas respectivas características (FERREIRA, 2016).

Levedura	Características	Referencias
<i>S. cerevisiae</i> Recombinante	Genes introduzidos para a assimilação da xilose.	(JIN; JEFFRIES, 2004)
<i>Scheffersomyces stipitis</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i> e <i>Candida shehatae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fermentadoras de xilose.</li> <li>• Precisam de oxigenação regulada para a produção máxima de etanol.</li> <li>• Requerem processo de destoxificação do hidrolisado.</li> </ul>	(LIGTHELM; PRIOR; PREEZ, 1988; SKOOG; JEPSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1992)
<i>Candida acidothermophilum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Termotolerante.</li> <li>• Podem atingir 80% da produção de etanol teórico.</li> </ul>	KADAM; SCHMIDT (1997)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resistência à pressão osmótica, inibição de outros micro-organismos, alta competição capacidade de assimilar diversos açúcares.</li> </ul>	(OLSSON; LINDÉN; HAHN-HÄGERDAL, 1992; OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1993)
<i>Pseudozyma brasiliensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metaboliza açúcares de cinco carbonos e secreta uma enzima de interesse, xilanase, em grande quantidade.</li> </ul>	(JIN; JEFFRIES 2004)

Além disso, tem-se buscado por meio de aplicações de conhecimentos de engenharia genética o desenvolvimento de novas linhagens recombinantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cujo objetivo é torná-las mais eficientes na fermentação de pentoses, para que seja possível o emprego destas em escala industrial (PEREIRA, 2013).

### 5.3 - Processos de fermentação

Considerando a exigência de uma conversão máxima dos açúcares em etanol, mas respeitando os limites de custo de produção considerados viáveis tanto do ponto de vista técnico quanto do econômico, a fermentação representa um outro ponto crítico no processo de obtenção do etanol de segunda geração. Fora isso, ainda é preciso levar em conta o consumo energético da fermentação, o que depende de suas condições operacionais, e o título de etanol no vinho final (BONOMI, 2010).

Desta forma, a obtenção de etanol de segunda geração tem sido estudada sob diferentes estratégias de processamento e, devido à presença de vários açúcares no meio reacional, muitas vezes o multiprocessamento, ou seja, o emprego simultâneo de enzimas e de microrganismos fermentadores mostra-se como uma alternativa eficiente. Pode-se ainda utilizar diferentes combinações de microrganismos em etapas sucessivas, de maneira que os açúcares sejam fermentados ao máximo (VÁSQUEZ, 2007).

Assim, existem quatro principais formas de realizar-se a etapa de fermentação, sendo elas: Hidrólise e Fermentação Separadas (SHF), Fermentação e Sacarificação Simultâneas (SSF), Sacarificação e Co-fermentação Simultâneas (SSCF) e Bioprocesso Consolidado (CPB) (NUNES et al., 2013).

Tais estratégias são comparadas na Figura 5.1, onde é possível notar as diferenças operacionais existentes entre as mesmas, as quais consistem no grau de integração entre as etapas de hidrólise da celulose, fermentação das pentoses, fermentação das hexoses e produção de enzimas.

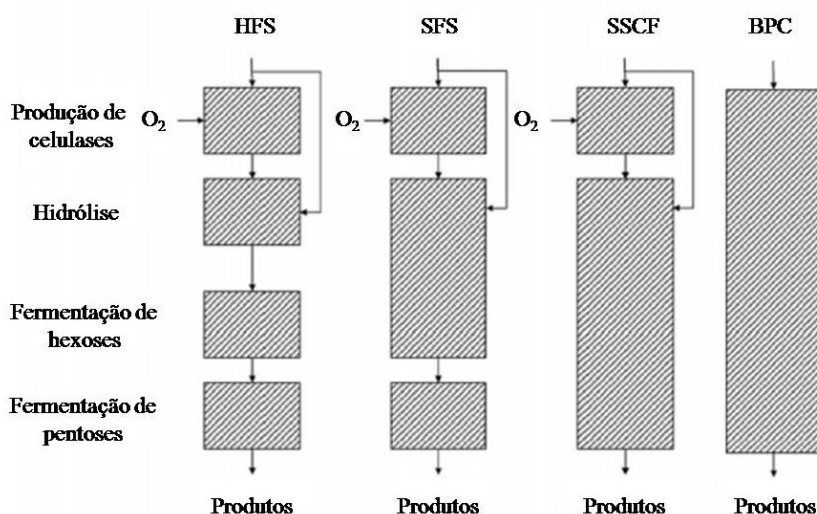


Figura 5.1 - Comparação das quatro diferentes estratégias de produção de etanol de segunda geração (GUILHERME, 2014).

A seguir esses processos serão discutidos de forma mais detalhada.

### 5.3.1 - Hidrólise e Fermentação Separadas (SHF)

Quando as etapas de hidrólise e fermentação são realizadas separadamente, a configuração é dita Hidrólise e Fermentação Separadas (SHF, sigla em inglês que significa *Separated Hydrolysis and Fermentation*) (SOUZA, 2016). Trata-se da concepção mais antiga

e como a hidrólise é realizada em uma etapa independente, pode ser feita por meios químicos ou enzimáticos (VÁSQUEZ, 2007).

A principal vantagem da configuração SHF é o fato de que, uma vez otimizados o pH e a temperatura de operação de cada uma das etapas, pode-se operá-la nas condições ótimas tanto da hidrólise quanto da fermentação (SOUZA, 2016). Além disso, é possível otimizar também o próprio projeto dos equipamentos, o que inclui os sistemas de agitação (GALBE; ZACCHI, 2010). Para termos de comparação, enquanto a temperatura ótima das celulases na hidrólise enzimática varia de 45 a 50 °C, a temperatura ótima da maior parte dos microrganismos fermentadores encontra-se na faixa de 30 a 37 °C (NUNES et al., 2013).

Em contrapartida, uma desvantagem é que há a possibilidade de ocorrer redução no rendimento do processo em virtude da inibição das enzimas hidrolíticas, principalmente endoglucanases pela celobiose e  $\beta$ -glucosidases pela glicose, compostos formados durante a hidrólise da celulose (NUNES et al., 2013; SOUZA, 2016). Além disso, em virtude do maior tempo reacional, o risco de haver contaminação em processos do tipo SHF é maior (TAHERZADEH; KARIMI, 2007 apud NUNES et al., 2013).

Outro ponto fraco da configuração SHF é a perda de açúcares durante a separação de sólidos e líquidos após a realização da hidrólise da celulose, que pode até ser reduzida por meio da lavagem com água, mas isto culmina com a diluição dos açúcares, o que também não é desejado (GALBE; ZACCHI, 2010).

A Figura 5.2 ilustra de forma geral o processo de Hidrólise e Fermentação Separadas, no qual a etapa de hidrólise da celulose é do tipo enzimática.

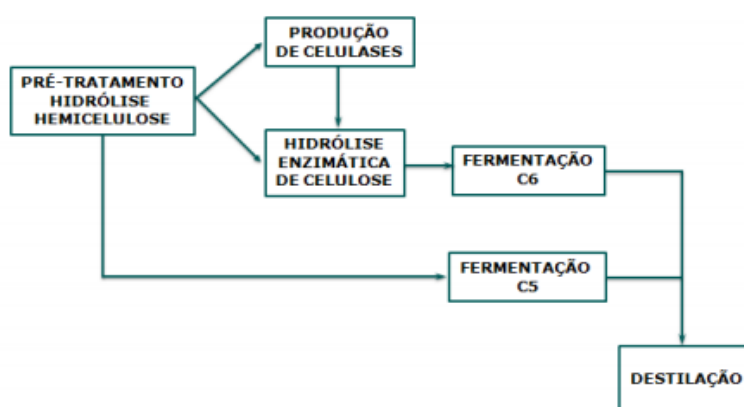


Figura 5.2 - Representação esquemática do processo de Hidrólise e Fermentação Separadas (SHF) (PEREIRA JR. et al., apud WINGREEN, 2008 apud SANTOS, 2012).



### 5.3.2 - Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF)

Ao contrário da configuração SHF, quando o processo é denominado de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF, sigla em inglês que significa *Simultaneous Saccharification and Fermentation*), as etapas de hidrólise e fermentação são realizadas simultaneamente, no mesmo equipamento (SOUZA, 2016). Entretanto, é importante esclarecer que quando fala-se em realizar a hidrólise e fermentação juntas, refere-se apenas à hidrólise da celulose e à fermentação das hexoses, pois a hidrólise da hemicelulose continua sendo realizada separadamente, assim como a fermentação das pentoses (NUNES et al., 2013).

Enquanto que no processo anterior a hidrólise pode ser ácida ou enzimática, no SSF, como ao passo que a hidrólise avança, os microrganismos fermentadores atuam sobre os açúcares gerados, a hidrólise da celulose é baseada no uso de enzimas, para que seja possível evitar a formação de inibidores da fermentação, assim como garantir uma atuação sinérgica com os microrganismos, o que não seria possível se a hidrólise ácida da celulose fosse promovida (VÁSQUEZ, 2007).

Um ponto positivo da configuração SSF é o tempo de operação, que geralmente é menor, aumentando a produtividade do processo. Além disso, com as duas etapas sendo realizadas simultaneamente, há uma redução de custos, assim como diminuição dos riscos de contaminação por outros microrganismos, o que deve-se à presença do etanol em elevadas concentrações no meio reacional conforme a fermentação ocorre (OHGREN et al., 2007; SHEN; AGBLEVOR, 2010 apud GUILHERME, 2014).

Com o uso desse processo, ainda há uma redução da inibição enzimática, provocada pela presença de açúcares advindos da hidrólise, pois a glicose é quase que completamente fermentada (GUILHERME, 2014). Outra contribuição que é obtida mantendo-se uma baixa concentração de glicose no meio reacional é o fato de que o equilíbrio das reações de hidrólise é favorecido, no sentido de formação de produtos (açúcares fermentescíveis), fornecendo insumo à fermentação (CASTRO; PEREIRA, 2010 apud DRABER, 2013). Devido à essas vantagens, a concepção SSF, quando comparada com a SHF, possui maior taxa de sacarificação e maior produção de etanol (SOUZA, 2016).

Um ponto crítico do processo SSF é que estudos de otimização precisam ser desenvolvidos para que as melhores condições de operação sejam encontradas, isto porque a temperatura, pH e condições de agitação são diferentes para as celulasas e para os microrganismos (NUNES et al., 2013; OHGREN et al., 2007 apud GUILHERME, 2014).

Desta forma, mesmo com o ganho de rendimento devido à menor inibição enzimática, este pode ser desfavorecido pelo fato das condições ótimas de operação das enzimas não serem empregadas, o que resulta em uma menor atividade enzimática. Enxerga-se como uma solução para este problema o emprego de microrganismos termotolerantes, os quais são capazes de permitir a aproximação da temperatura do processo à temperatura ótima de atividade das celulasas (TAHERZADEH; KARIMI, 2007 apud SANTOS, 2012). Pode-se citar como exemplo de microrganismo termofílico a bactéria *Thermoanaerobacter ethanolicus* e de microrganismos mesófilos, as bactérias *Zymomonas mobilis*, *Escherichia colie* e *Klebsiella* (JARDINE et al., 2009).

Outra desvantagem da SSF é que o etanol presente na celulignina pré-tratada apresenta-se como um potencial inibidor da atividade enzimática, que mesmo sendo menos prejudicial do que a inibição causada pela presença de glicose e celobiose, pode alcançar até 25% de inibição, considerando sua concentração em 30 g/L (WU; LEE, 1997 apud SANTOS, 2012).

Ainda, outro fator negativo do processo SSF é que a fermentação é realizada em meio fermentativo contendo uma suspensão de sólidos, majoritariamente lignina, o que desfavorece a transferência de massa e a reciclagem da levedura por filtração ou centrifugação. Já a configuração SHF apresenta meio fermentativo completamente líquido (GALBE; ZACCHI, 2010).

Entretanto, mesmo possuindo algumas desvantagens, considera-se a configuração SSF como a melhor opção, baseando tal conclusão em estudos que têm indicado maior rendimento do processo SSF frente ao SHF em termos de produção de etanol, ambos a partir de madeiras de fibras longas e resíduos agrícolas (GALBE; ZACCHI, 2010). Porém, em termos de controle das condições operacionais, conforme já discutido anteriormente, o processo SHF mostra-se superior ao SSF (SANTOS, 2014).

A Figura 5.3 mostra, de forma simplificada, o fluxograma correspondente ao processo SSF.

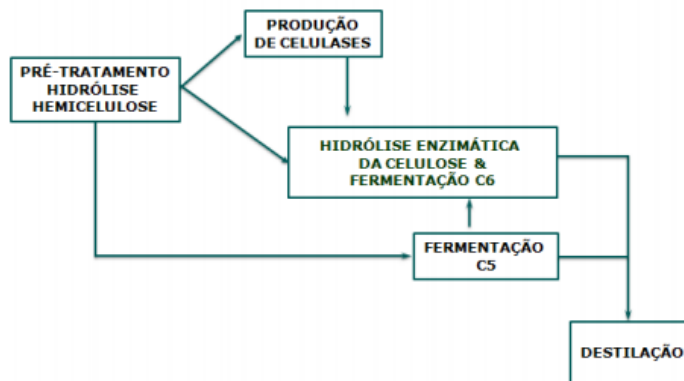


Figura 5.3 - Representação esquemática do processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF) (PEREIRA JR. et al., apud WINGREEN, 2008 apud SANTOS, 2012).

### 5.3.3 - Sacarificação e Co-fermentação Simultâneas (SSCF)

O processo de Sacarificação e Co-fermentação Simultâneas (SSCF, sigla em inglês que significa *Simultaneous Saccharification and Cofermentation*) apresenta uma configuração tal que a hidrólise da celulose e a co-fermentação de todos os açúcares gerados a partir da biomassa lignocelulósica, ou seja, hexoses e pentoses, ocorrem na mesma etapa (BERNARDO NETO, 2009). Para que isto seja possível, não há a separação do hidrolisado hemicelulósico da celulose após o pré-tratamento, o que significa que enquanto a celulose passa pelo processo de sacarificação e posteriormente de fermentação, os açúcares advindos da hemicelulose são fermentados (TEIXEIRA et al., 2000 apud SANTOS, 2012).

Um fluxograma simplificado da configuração SSCF é mostrado na Figura 5.4.

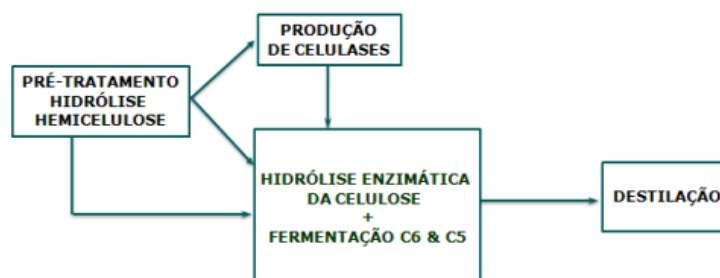


Figura 5.4 - Representação esquemática do processo de Sacarificação e Co-fermentação Simultâneas (SSCF) (PEREIRA JR. et al., apud WINGREEN, 2008 apud SANTOS, 2012).

Como essa concepção de processo realiza três etapas distintas (hidrólise da celulose, fermentação das pentoses e fermentação das hexoses) em um único reator, sua principal

vantagem é a redução do número de reatores envolvidos. Além disso, ainda evita-se problemas de inibição enzimática pelos açúcares gerados, visto que estes são consumidos na fermentação (HAMELINCK et al., 2005 apud DRABER, 2013).

A desvantagem mais significativa do processo SSCF é que a sua realização depende de grande aplicação de engenharia genética, visto que a fermentação tanto das hexoses quanto das pentoses deve ser promovida por um mesmo microrganismo e de forma eficiente. Pode-se citar como exemplo de melhoramento genético linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* e linhagens recombinantes de *Zymomonas mobilis* (AGRAWAL et al., 2011; LAWFORD; ROUSSEAU, 1998; McMILLAN et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2000; ZHOU et al., 2011 apud SANTOS, 2012; JARDINE et al., 2009; NUNES et al., 2013).

#### 5.3.4 - Bioprocesso Consolidado (CPB)

O processo denominado de Bioprocesso Consolidado (CPB, sigla em inglês que significa *Consolidated Bioprocessing*) caracteriza-se por apresentar o máximo de integração entre as etapas envolvidas na produção de etanol 2G, sendo realizadas simultaneamente a produção de enzimas, a hidrólise enzimática da celulose e a fermentação das pentoses e hexoses, tudo isso sendo feito por um mesmo microrganismo (SANTOS, 2012).

Como principal vantagem do CBP tem-se o fato de que este possui um custo de produção inferior às demais configurações, visto que não apresenta gastos relacionados à compra de enzimas ou à sua produção em etapa independente, contribuindo com a redução dos custos de operação e de investimento de capital (LYND et al., 2002 apud NUNES et al., 2013).

A Figura 5.5 representa o fluxograma geral do Bioprocesso Consolidado (CPB), no qual é possível notar que apenas a etapa de hidrólise da hemicelulose (pré-tratamento) é feita de forma independente das demais.

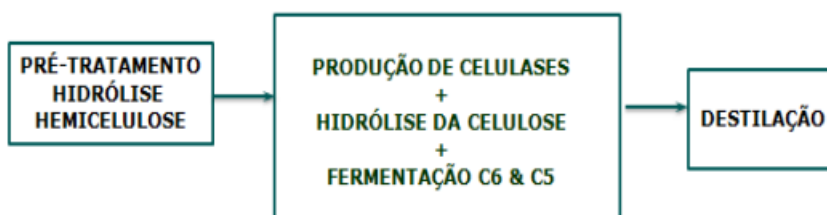


Figura 5.5 - Representação esquemática da configuração Bioprocesso Consolidado (CPB) (PEREIRA JR. et al., apud WINGREEN, 2008 apud SANTOS, 2012).

Pode-se dizer que considerando como critérios os custos associados ao processo e o desenvolvimento tecnológico, a estratégia do Bioprocesso Consolidado (CPB) é a ideal a ser empregada. Entretanto, um problema associado à sua aplicação industrial é a necessidade dos microrganismos utilizados serem capazes de produzir as enzimas que promovem a clivagem dos polissacarídeos e ainda possuírem elevado potencial fermentativo da biomassa, o que não é observado nos microrganismos disponíveis atualmente, como por exemplo, *Clostridium thermocellum* e *Clostridium cellulolyticum*. Tal fato torna mais uma vez a aplicação de técnicas de engenharia genética inevitável para a construção de novas linhagens microbiológicas (VÁSQUEZ, 2007; OLSON et al., 2012 apud SANTOS, 2012).

De acordo com VÁSQUEZ (2007), há também, em um horizonte tecnológico futuro, a possibilidade de desenvolvimento de um processo no qual inclusive a etapa de hidrólise da hemicelulose seja feita juntamente com as demais, com o uso do mesmo microrganismo. Porém, para que isto torne-se real, a engenharia genética terá papel fundamental.

A Figura 5.6 representa esta possível configuração.

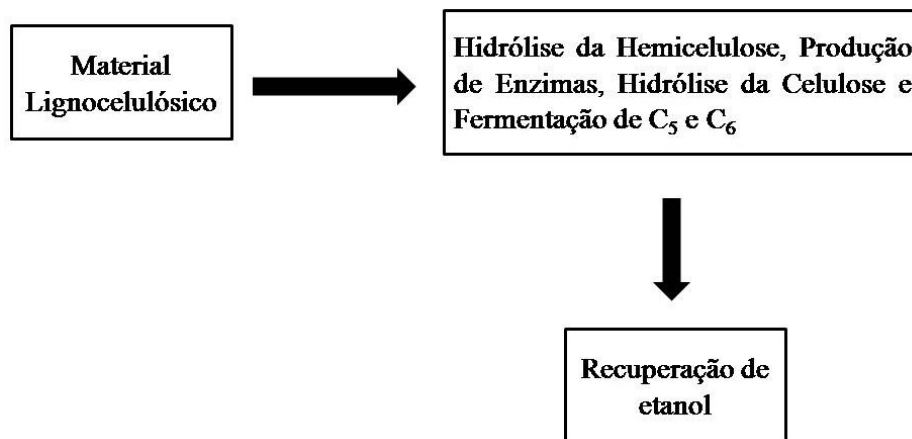


Figura 5.6 - Fluxograma representativo do processo no qual todas as etapas críticas da produção de etanol 2G são realizadas simultaneamente (VÁSQUEZ, 2007).

## CAPÍTULO 6

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mesmo que atualmente as fontes de energia derivadas do petróleo ainda possuam capacidade suficiente para atenderem às necessidades energéticas do planeta, é indiscutível que estas não são renováveis e que geram prejuízos ao meio ambiente e à qualidade de vida. Além disso, como tem sido mostrado por dados publicados por instituições associadas ao setor de energia, a demanda energética aumenta continuamente ano após ano. Portanto, volta-se a atenção para as fontes de energia renováveis.

Diante desse cenário, existem novas fontes energéticas que vêm sendo estudadas e aprimoradas, como por exemplo, a energia eólica, o biodiesel, o biogás, a energia solar e o etanol de segunda geração. Em relação a este último verifica-se, por meio do estudo realizado neste Trabalho de Conclusão de Curso, que representa uma potencial alternativa a ser empregada.

Devido às suas características, o etanol de segunda geração possui vantagens representativas, sendo a principal o fato de que se realmente a sua produção concretizar-se a nível industrial e comercial, esta pode aumentar significativamente a produção de bioetanol, mas sem exigir o aumento paralelo da área agricultável, visto que a sua matéria-prima consiste em materiais lignocelulósicos, dos quais grande parte é originada como resíduo de outras atividades.

Outras vantagens do etanol 2G são que ele representa uma oportunidade de retirar do ambiente resíduos que muitas vezes não são reaproveitados, sua matéria-prima tem maior potencial de produção de bioetanol do que o observado para a maioria das fontes comuns de açúcares empregadas na produção do etanol 1G, seu processo produtivo apresenta uma variabilidade muito grande do material que pode ser usado como fonte de açúcar e a aplicação da lignina residual para cogeração de energia ou produção de insumos de elevado valor agregado.

Entretanto, pode-se afirmar que ainda existem muitos empecilhos à consolidação do etanol 2G. Dentre estes, pode-se elencar a competição direta entre o uso da lignocelulose para produção de bioetanol e o uso para cogeração de energia. Além disso, a própria operação do processo produtivo é atualmente um desafio, pois por ser complexo e apresentar procedimentos que não encontram-se ainda totalmente estabelecidos, por exemplo, pré-

tratamento, hidrólise, destoxificação do hidrolisado e fermentação de pentoses, possui difícil controle operacional, não alcança a produção teórica da qual as matérias-primas são capazes e encarece o produto final.

Porém, em virtude das vantagens do uso do etanol 2G apresentadas anteriormente, muitas pesquisas que encontram-se em desenvolvimento, tanto as realizadas nos centros acadêmicos quanto nas próprias empresas do setor sucroenergético, visam resolver ou no mínimo reduzir os pontos fracos hoje existentes no processo produtivo desse biocombustível.

Nesse sentido, alguns aspectos que atualmente representam focos de estudo são: a escolha do tipo de pré-tratamento e do tipo de hidrólise mais adequados para cada material lignocelulósico empregado, o estabelecimento das condições ótimas de operação de cada etapa, a seleção de microrganismos mais eficientes e resistentes, a redução da produção de compostos inibitórios e o melhoramento genético tanto da matéria-prima quanto dos microrganismos usados.

Diante disso, pode-se dizer que a concretização do etanol de segunda geração como fonte de energia tem como ponto de apoio tais pesquisas, as quais representam a oportunidade de torná-lo tão competitivo quanto o etanol de primeira geração.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, E. T. de; CARVALHO, S. R. G. de; SOUZA, L. F. de. Programa do Proálcool e o Etanol no Brasil. ENGEVISTA, V. 11, n. 2. p. 127-136, dez. 2009.
- ANDRADE, L. F. de. Produção de etanol de segunda geração. 2014. 30 p. Monografia (Especialista em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2014.
- ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol - Brasil, 30 anos na vanguarda. MultiCiência: Revista Multidisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp. Construindo a História dos Produtos Naturais, n. 7, out. 2006.
- ARAÚJO, C. R. de et al. Estudo das rotas de hidrólise química e biológica para a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos. Revista Eletrônica SEPA - Seminário Estudantil de Produção Acadêmica, UNIFACS, v. 12, 2013.
- ARRUDA, P. V. et al. Efeito da destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana sobre a remoção de fenóis, a perda de açúcares e a bioconversão de xilose em xilitol. Nucleus, v. 5. n. 1, abr. 2008.
- ASSUMPCÃO, S. M. N. de. Pré-tratamento químico combinado do bagaço de cana visando a produção de etanol de segunda geração. 2015. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA, 2015.
- BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. Progress in Energy and Combustion Science, v. 34, p. 551-573, jan. 2008.
- BAUDEL, H. M. Pré-tratamento e hidrólise. III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise – Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol. São Paulo, dez. 2006.
- BERNARDO NETO, O. Integração das principais tecnologias de obtenção de etanol através do processamento de celulose (2ª geração) nas atuais usinas de processamento de cana-de-açúcar (1ª geração). 2009. 137 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Área de Concentração em Engenharia de Sistemas) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2009.
- BNDES; CGEE. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES. 2008. 316 p.
- BONOMI, A. Workshop hidrólise de material lignocelulósico. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Blucher, 2010. p. 679-696.
- BORTOLAZZO, N. G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. 2011. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Área de Concentração em Microbiologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP, 2011.
- BRASIL. Empresa de Pesquisa Energética. Balanco Energético Nacional 2015: Ano base 2014. Rio de Janeiro, 2015a.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia, Petróleo brasileiro S.A. (PETROBRAS). Biocombustíveis: 50 perguntas e respostas sobre este novo mercado. 2007. 44 p.
- BRASIL. Portal Brasil. Governo estabelece adição de 27% de etanol na gasolina. 2015b. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/03/adicao-de-27-de-etanol-na-gasolina-e-estabelecida-pelo-governo>>. Acesso em: 03 de dezembro de 2017.
- BRIENZO, M. Extração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilooligossacarídeos. 2010. 134 p. Tese (Doutorado em Ciências e Área de Concentração



- em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena - SP, 2010.
- BRONZATO, G. R. F. Investigação da biomassa de *Eichhornia crassipes* (aguapé) para a obtenção de etanol de segunda geração como um processo mitigatório da poluição aquática. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia e Área de Concentração em Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista, Botucatu - SP, 2016.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D. dos; SOUZA, A. P. de. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Blucher, 2010. p. 365-380.
- CARPIO, L. G. T.; SOUZA, F. S. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: scenarios of cost reductions. Renewable Energy, v. 105, p. 1-798, maio 2017.
- CARVALHO, L. C. et al. Cana-de-açúcar e álcool combustível: histórico, sustentabilidade e segurança energética. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, N.16; p. 530, 2013.
- CARVALHO, M. L. Estudo cinético da Hidrólise Enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2011.
- CHEMMÉS, C. S. et al. Estudo de métodos físico-químicos no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração. In: XII SEPA - SEMINÁRIO ESTUDANTIL DE PRODUÇÃO ACADÊMICA, UNIFACS, v. 12, 2013. Disponível em: <<http://www.revistas.unifacs.br/index.php/sepa/issue/view/180/showToc>>. Acesso em: 09 de julho de 2017.
- CNPEN. BNDES estima que etanol celulósico será viável em 2021. Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, 2015. Disponível em: <<http://cnpem.br/bndes-estima-que-etanol-celulosico-sera-viavel-em-2021/>>. Acesso em: 20 dez. 2017.
- CNPEN. Futuro brilhante do etanol celulósico está ameaçado. Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, 2016. Disponível em: <<http://cnpem.br/futuro-brilhante-etanol-celulosico-esta-ameacado/#top>>. Acesso em: 07 de agosto de 2017.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), Brasília, v. 3, n. 4, p. 1-77, abr. 2017. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&ordem=M%EAs/Ano%20da%20publica%E7%E3o&Pagina\\_objcmsconteudos=2#A\\_objcmsconteudos](http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&ordem=M%EAs/Ano%20da%20publica%E7%E3o&Pagina_objcmsconteudos=2#A_objcmsconteudos)>. Acesso em: 03 de dezembro de 2017.
- DEMIRBAS, A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. Energy Conversion and Management, v. 49, n. 8, 2106-2116, 2008.
- DRABER, K. M. M. Etanol de segunda geração já é realidade. 2013. 54f. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia Bioquímica) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena - SP, 2013.
- DUPONT, F. H.; GRASSI, F.; ROMITTI, L. Energias renováveis: buscando por uma matriz energética sustentável. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, Santa Maria, v. 19, n. 1, Ed. Especial, p. 70-81, ago./2015.
- FELIPE, M. G. A.; ROSSEL, C. E. V. Roadmap tecnológico para o etanol: componente hidrólise. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Blucher, 2010. p. 909 - 918.
- FERREIRA, A. D. Produção eficiente de etanol 2G a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar: otimizando condições de cultivo e operacionais. 2016. 153 p.

- Tese (Doutorado em Ciências e Área de Concentração em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena - SP, 2016.
- FONSECA, B. G. Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis*. 2009. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Área de Concentração em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena - SP, 2009.
- FURLAN, A. D. F. Produção de Bioetanol de Segunda Geração pelo Consórcio *Zymomonas mobilis* CCT4494 e *Candida tropicalis* em Resíduos de Uvas Isabel e Bordô. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto - SP, 2015.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Blucher, 2010. p. 697-716.
- GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. Energy Policy, v. 36, n. 8, 2086-2097, 2008a.
- GOLDEMBERG, J.; NIGRO, F. E. B.; COELHO, S. T. Bioenergia no estado de São Paulo: Situação atual, perspectivas, barreiras e propostas. Imprensa Oficial do Estado de São Paulo. São Paulo, 2008b. 152p. : il. p.
- GRANBIO. Bioflex I. 2017. Disponível em: <<http://www.granbio.com.br/conteudos/biocombustiveis/>>. Acesso em: 15 de junho de 2017.
- GUILHERME, A. A. Estudo experimental e modelagem do processo de sacarificação e fermentação simultânea utilizando bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol. 2014. 258 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal - RN, 2014.
- GURGEL, L. V. A. Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar: estudo cinético de sacarificação de celulose para produção de etanol. 2010. 315 p. Tese (Doutorado em Ciências e Área de Concentração em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, 2010.
- JARDINE, J. G.; DISPATO, I.; PERES, M. R. Considerações sobre o bioetanol lignocelulósico para subsidiar a elaboração de conteúdo da Árvore de Conhecimento Agroenergia. Campinas, SP: Embrapa Informática Agropecuária, 2009. 28 p.: il. – (Documentos / Embrapa Informática Agropecuária; 95).
- KLOCK, U. Química da madeira: celulose. 2013. 51 p. Notas de Aula. Disponível em: <<http://www.madeira.ufpr.br/disciplinasklock/quimicadamadeira/celulose2013.pdf>>. Acesso em: 04 de dezembro de 2017.
- LIMA, A. L. A. Biorreatores utilizados na hidrólise enzimática para produção de etanol de segunda geração. 2013. 46 p. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia Bioquímica) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena - SP, 2013.
- LIMA, A. O. S.; RODRIGUES, A. L. Sacarificação de resíduos celulósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa. Revista de ciências ambientais, v. 1, n. 2, p. 5-18, 2007.
- MACHADO, D. S. Seleção de fungos capazes de hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. 2009. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP, 2009.

- MANOCHIO, C. Produção de Bioetanol de cana-de-açúcar, milho e beterraba: uma comparação dos indicadores tecnológicos, ambientais e econômicos. 2014. 33 f. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas - MG, 2014.
- MARIANI FILHO, L. Utilização da palha da cana-de-açúcar para aumento da capacidade energética de plantas de utilidades. 2006. 58p. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia Mecânica) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2006.
- MARTINS, C. A. P. Avaliação do efeito do inóculo e do perfil de alimentação do mosto na produção em escala piloto e industrial de etanol. 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Área de Concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2009.
- MARTINS, L. F. Caracterização do complexo celulósico de *Penicillium echinulatum*. 2005. Dissertação (Mestrado em Química e Subárea Química Orgânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- MENDES, F. M. Digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar tratado quimio-mecanicamente. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena - SP, 2010.
- MILANEZ, A. Y. et al. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar - uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. BNDES Setorial, n. 41, 2015.
- NOVACANA. A cana-de-açúcar como fonte de energia elétrica. 2017a. Disponível em: <<https://www.novacana.com/estudos/a-cana-de-acucar-como-fonte-de-energia-eletrica-241013/>>. Acesso em: 31 de maio de 2017.
- NOVACANA. Bagaço e palha da cana podem ganhar o mundo e abrir novo mercado para usinas. 2016a. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/cana/mercado/bagaco-cana-ganhar-mundo-novo-mercado-usinas-110316/>>. Acesso em: 31 de maio de 2017.
- NOVACANA. GranBio admite atraso em usina, mas espera etanol 2G competitivo em 2019. 2017b. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/granbio-atraso-usina-etanol-2g-competitivo-2019-010617/>>. Acesso em: 08 de agosto de 2017.
- NOVACANA. Opinião: Por que as primeiras plantas comerciais de etanol 2G são quase experimentais?. 2016b. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/opinio-primeiras-plantas-comerciais-etanol-2g-quase-experimentais-081116/>>. Acesso em: 08 de agosto de 2017.
- NOVACANA. Raízen fala em ampliar produção de etanol celulósico ou construir nova usina. 2017c. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/raizen-ampliar-producao-etanol-celulosico-construir-nova-usina-220317/>>. Acesso em: 15 de junho de 2017.
- NUNES, R. M. et al. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. Revista Liberato, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez. 2013.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. Química Nova, vol. 33, No. 7, 1549-1558, 2010.
- OLIVEIRA, F. M. V. de. Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana. 2010. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena - SP, 2010.

- PEREIRA, D. G. S. Rendimentos da hidrólise enzimática e fermentação alcoólica de capim-elefante, capim-andropogon, capim-mombaça e bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2013.
- PITARELO, A. P. et al. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Química nova, v. 35, n. 8, p. 1502–1509, 2012.
- PITARELO, A. P. Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. 2013. Tese (Doutorado em Química e Subárea de Química Orgânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 2013.
- RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. 2010. 414 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2010.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. Química Nova, v. 26, p. 863-871, 2003.
- REN21. Renewables 2014 Global Status Report. Paris: REN21 Secretariat. 2014.
- RIBEIRO, E. J. Fermentação alcoólica: matérias primas amiláceas e lignocelulósicas. 01-30 de jan. de 2013. 484 p. Notas de Aula.
- ROSA, S. E. S. da; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. Revista do BNDES 32, dez. 2009.
- SAAD, M. B. W. Avaliação técnica e econômica preliminar da produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. 2010. 138 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena - SP, 2010.
- SANTOS, D. S. Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica. 2012. 218 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro - RJ, 2012.
- SANTOS, F. A. Avaliação do pré-tratamento hidrotérmico de palhas de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. 2013. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2013.
- SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-aucar para produção de etanol. Química nova, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.
- SANTOS, M. F. R. F. dos. Elaboração do Technology roadmap para biorrefinaria de produtos da lignina no Brasil. 2011. 307 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, 2011.
- SANTOS, M. S. R. dos. Estudo de pré-tratamentos de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2G. 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió - AL, 2014.
- SILVA, A.P.; MEERT, D.; FINAMORE, W. L. de M. Aproveitamento da palha da cana-de-açúcar pós-colheita mecanizada. A Revista Eletrônica da Faculdade de Ciências Exatas e da Terra. Produção/construção e tecnologia, v. 5, n. 8, 2016.
- SILVA, F. V. Panorama e perspectivas do etanol lignocelulósico. Rev. Liberato, Novo Hamburgo, v. 13, n. 20, p. 01-XX, jul./dez. 2012.
- SILVA, R. O. da. Bioprospecção de leveduras fermentadoras de xilose visando a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. 2015. 134 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto - SP, 2015.

- SOARES, P. A.; OLIVÉRIO, J. L. Hidrólise ácida - uma experiência prática: o processo DHR (Dedini Hidrólise Rápida). Workshop de etanol, Instituto de Economia da UFRJ, São Paulo, 28 de dez. de 2008.
- SOUZA, R. B. A. de. Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar. 2016. 106 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Área de Concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2016.
- SOUZA, S. P. de. Produção integrada de biocombustíveis: uma proposta para reduzir o uso de combustível fóssil no ciclo de vida do etanol de cana-de-açúcar. 2010. 142p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, 2010.
- SUAREZ, C. A. G. Otimização da produção de etanol 2G a partir de hexoses e pentoses. 2014. 165 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Área de Concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2014.
- ULHOA, S. A. Produção de biocombustíveis: um panorama sobre o discurso ambiental e econômico. Acervo da Iniciação Científica, n. 2, 2013.
- UNICA. Setor sucroenergético/FAQ. União da Indústria de Cana-de-Açúcar, 2015. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/faq/>>. Acesso em: 20 de maio de 2017.
- URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BOODEY, R. M. Produção de biocombustíveis: a questão do balanço energético. Rev. de Política Agrícola, ano XIV, n. 1, jan./fev./mar. 2005.
- VÁSQUEZ, M. P. Desenvolvimento de Processo de Hidrólise Enzimática e Fermentação Simultâneas para a Produção de Etanol a Partir de Bagaço de Cana-de-Açúcar. 2007. 205 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, 2007.
- VERARDI, A. et al. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. In: LIMA, M. A. P.; NATALENSE, A. P. P. (Editores). Bioethanol. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. p. 95-122.
- WOLF, L. D. Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de xilooligômeros. 2011. 147 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Área de Concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2011.
- ZANARDI, M. S.; COSTA JUNIOR, E. F. Tecnologia e perspectiva da produção de etanol no Brasil. Revista Liberato, Novo Hamburgo, v. 17, n. 27, p. 01-118, jan./jun. 2016.