

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

MARIANA DE LUCENA SOARES

**EFEITOS DO TEOR DE LIGNINA NA SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO
SIMULTÂNEA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE
ETANOL**

Recife

2013

MARIANA DE LUCENA SOARES

**EFEITOS DO TEOR DE LIGNINA NA SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO
SIMULTÂNEA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE
ETANOL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ester Ribeiro Gouveia

**Recife
2013**

MARIANA DE LUCENA SOARES

**EFEITOS DO TEOR DE LIGNINA NA SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO
SIMULTÂNEA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE
ETANOL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Ester Ribeiro Gouveia
UFPE

Profª Drª Fernanda Leitão Vaz
UFPE

Profª Drª Líbia de Sousa Conrado Oliveira
UFPE

Recife, 04 de setembro de 2012

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Soares, Mariana de Lucena

Efeitos do teor de lignina na sacarificação e fermentação simultânea do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol/ Mariana de Lucena Soares– Recife: O Autor, 2013.

44 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ester Ribeiro Gouveia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia Industrial, 2012.

Inclui bibliografia

1. Etanol 2. Cana-de-açúcar- bagaço 3. Lignina I. Gouveia, Ester Ribeiro (orientadora) II. Título

662.6692

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 041

*Dedico este trabalho a toda minha família, pelas
palavras de incentivo e por
todo apoio que me foi
concedido.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Silvana e Bernardino, por apoiar minhas escolhas profissionais, estando ao meu lado sempre que precisei. E ao meu irmão, Matheus, tão querido.

A toda minha família, em especial, à minha avó Anália, à tia leda, à tia lara, pelas palavras de confiança e incentivo.

Aos meus maravilhosos amigos, Thyanne, Mayara e Luiz pela amizade sincera, pelo carinho, ajuda nos momentos difíceis e conselhos nos momentos de dúvida. Por estarem presentes desde minha graduação, me incentivando e apoiando para que eu conclua mais uma etapa em minha vida.

Aos tantos outros amigos não menos importantes, Rodolfo, Adauto, Rafael, Paula, Dani, Natália e Suzana por me acompanhar em cada passo que foi dado com sucesso ou não, pelos momentos descontraídos e pelas palavras amigas tão necessárias.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Ester Ribeiro Gouveia, pela oportunidade, pelos ensinamentos transmitidos neste mestrado, pela paciência, pela orientação e por ser fundamental na concretização deste trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Processos Biotecnológicos, em especial, à Carol e David, pela ajuda e pelos esclarecimentos a cerca do meu trabalho e tantas outras coisas que acompanharam nosso convívio em laboratório.

À minha turma do mestrado, em especial, a Danilo, Rebeqa e Edkarla, pelos sorrisos distribuídos e pelo tempo que passamos juntos estudando e ajudando uns aos outros.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

À Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, à coordenação e à secretaria do Programa.

A todos que acreditaram em mim e que torcem pelo meu sucesso. Aos amigos distantes, familiares e professores que contribuíram de forma direta ou indireta nesta caminhada.

RESUMO

O bagaço de cana-de-açúcar compreende um dos principais resíduos agroindustriais produzidos no Brasil, e que pode ser utilizado como matéria prima para produção de etanol. Devido a sua natureza heterogênea, pré-tratamentos tem sido propostos para desestruturar a biomassa lignocelulósica e assim maximizar a eficiência da etapa de hidrólise enzimática para obtenção de açúcares fermentescíveis. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento de deslignificação alcalina na sacarificação e fermentação simultânea (SSF) de bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado por explosão a vapor, para produção de etanol. Foram utilizados materiais não deslignificados (ND) e deslignificados com 0,5 e 1 % de NaOH (D 0,5 % e D 1 %). As SSF em batelada foram conduzidas em erlenmeyers de 250 mL, com 8 g de bagaço, 100 mL de tampão citrato de sódio (pH 4,8) e preparações comerciais de celulases e β -glicosidase, 10 FPU/g de celulose e 5% v/v, respectivamente. Inicialmente foi realizada uma etapa de pré-sacarificação a 50°C e 150 rpm durante 6 horas, e logo após este período, a temperatura e a agitação foram reduzidas para 37°C e 80 rpm respectivamente, em que foi inoculada uma suspensão de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238. Para aumentar a produção de etanol também foi realizada uma batelada alimentada iniciando-se com 8 g de bagaço e adicionando-se 1 g a cada 24 horas até 120 horas. A etapa de deslignificação alcalina seguida do pré-tratamento por explosão a vapor contribuiu para a remoção de 52 % e 77 % da lignina para o material D 0,5 % e D 1 %, respectivamente. O material D 0,5 % apresentou valores de conversão de celulose em etanol não significativamente diferentes daqueles obtidos com o material D 1 %. A redução do teor de lignina alcançado na deslignificação com 0,5 % de NaOH, associada à SSF em batelada alimentada, permitiu o aumento da produção de etanol em 700 % em relação ao material não deslignificado e em 102 % em relação ao material deslignificado com o dobro de NaOH.

Palavras-chave: Explosão a vapor. Deslignificação alcalina. SSF. Batelada alimentada.

ABSTRACT

Bagasse from sugar cane comprises a major agroindustrial waste produced in Brazil, and which can be used as raw material for ethanol production. Due to its heterogeneous nature, pretreatments have been proposed to disrupt the lignocellulosic biomass, maximize the efficiency of enzymatic hydrolysis step for obtaining fermentable sugars. This study aimed to evaluate the treatment effect of alkaline delignification in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of bagasse cane sugar, pretreated by steam explosion, for ethanol production. Materials have been used not deslignification (ND) and deslignification with 0.5 and 1% NaOH (D 0.5 % and 1 %). The SSF batch were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks with 8 g of bagasse, 100 ml of sodium citrate buffer (pH 4.8) and commercial preparations of cellulase and β -glucosidase, 10 FPU/g cellulose and 5% v/v, respectively. Initially a pre-saccharification step at 50 °C and 150 rpm for 6 hours, and after this period, the temperature and agitation were reduced to 37 °C and 80 rpm respectively in a suspension that was inoculated with *S. cerevisiae* UFPEDA 1238. To increase ethanol production was also performed a fed batch starting with 8 g of bagasse and adding 1g every 24 hours to 120 hours. The alkaline delignification stage pretreatment followed by steam explosion contributed to the removal of 52 % and 77 % lignin for the material D 0.5 % and 1 % respectively. Material D 0.5 % had values of conversion of cellulose to ethanol does not significantly different from those obtained with the material D 1 %. The reduction of lignin content in the delignification achieved with 0.5 % NaOH, SSF associated with the fed-batch, allowed increased ethanol production by 700 % over the material does not deslignification and 102 % compared with the material deslignification twice NaOH.

Keywords: Steam explosion. Alkaline deslignification. SSF. Fed batch.

Sumário

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO | 1 |
| OBJETIVOS | 4 |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 5 |
| 3.1 Produção de etanol na matriz energética brasileira | 5 |
| 3.2 O bagaço de cana-de-açúcar como fonte alternativa de matéria-prima..... | 7 |
| 3.3 Composição química dos materiais lignocelulósicos | 10 |
| 3.4 Pré-tratamento por explosão a vapor e deslignificação alcalina da biomassa vegetal..... | 12 |
| 3.5 Hidrólise enzimática e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar..... | 16 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 4.1 Bagaço de cana-de-açúcar..... | 20 |
| 4.2 Enzimas..... | 20 |
| 4.3 Micro-organismo | 20 |
| 4.4 Meios de cultura | 20 |
| 4.5 Preparo de inóculo..... | 21 |
| 4.6 Deslignificação do bagaço pré-tratado por explosão a vapor..... | 21 |
| 4.7 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar..... | 22 |
| 4.7.1 Determinação da lignina solúvel e insolúvel..... | 23 |
| 4.7.2 Determinação do conteúdo de cinzas..... | 24 |
| 4.8 Determinação das atividades enzimáticas..... | 25 |
| 4.9 Sacarificação e fermentação simultânea..... | 28 |
| 4.10 Hidrólise enzimática..... | 29 |
| 4.11 Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, etanol, hidroximetilfurfural e furfural..... | 29 |
| 4.12 Parâmetros cinéticos da fermentação..... | 29 |
| 4.12.1 Rendimento (Y_p/s)..... | 29 |
| 4.12.2 Eficiência da fermentação (Ef)..... | 30 |
| 4.12.3 Produtividade volumétrica máxima em produto (Q_p)..... | 30 |
| 4.13 Conversão de celulose em etanol (ECC)..... | 31 |
| 4.14 Conversão de celulose em glicose (Cc)..... | 31 |
| 4.15 Análise de variância..... | 32 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 34 |

| | |
|---|----|
| 5.1 Conversão de celulose em glicose durante hidrólises enzimáticas dos materiais com diferentes teores de lignina..... | 34 |
| 5.2 Conversão de celulose em etanol durante as SSF dos matérias com diferentes teores de lignina..... | 36 |
| 5.3 Comparação entre as sacarificações e fermentações simultâneas..... | 43 |
| 6. CONCLUSÕES | 46 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 47 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 3.1: Produção de etanol carburante durante as safras 2010/2011 e 2011/2012..... | 6 |
| Figura 3.2: Arquitetura da parede celular. | 9 |
| Figura 3.3: Estrutura química da celulose..... | 10 |
| Figura 3.4: Representação esquemática da hemicelulose..... | 11 |
| Figura 3.5: Representação esquemática da lignina de eucalipto <i>Eucalyptus grandis</i> | 12 |
| Figura 3.6: Representação esquemática geral da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica..... | 13 |
| Figura 3.7: Hidrólise de 4-O-metil-glucuranoxilana e celulose. (1) Arabinose, (2) Xilose, (3) Xilooligômeros acetilados, (4) Xilooligômeros de grande massa molecular, (5) Oligossacarídeos, (6) Glicose, (7) Celobiose, (8) Celooligômeros, (9) Furfural, (10) Hidroximetilfurfural, (11) Ácido levulínico, (12) Furano e (13) Ácido furanóico..... | 15 |
| Figura 3.8: Esquema ilustrativo da atuação das enzimas celulolíticas nas cadeias de celulose..... | 17 |
| Figura 5.1: Concentração de glicose e conversão de celulose durante as hidrólises enzimáticas dos materiais deslignificados (D 0,5 % e D 1 %). A linha tracejada apresenta o momento da redução da temperatura e da agitação..... | 35 |
| Figura 5.2: Concentração de glicose durante as sacarificações e fermentações simultâneas utilizando os materiais ND, D 0,5 % e D 1 %..... | 37 |
| Figura 5.3: Concentração de etanol durante as sacarificações e fermentações simultâneas dos materiais ND, D 0,5% e D1%..... | 38 |

| | |
|---|----|
| Figura 5.4: Conversão de celulose em etanol nas sacarificações e fermentações simultâneas dos materiais ND, D 0,5% e D 1%..... | 39 |
| Figura 5.5: Concentração de glicose e de etanol em SSF do bagaço D 0,5 % e em batelada..... | 40 |
| Figura 5.6: Concentração de glicose e de etanol em SSF do material D 0,5 % e em batelada alimentada..... | 41 |
| Figura 5.7: Conversão de celulose em etanol nas SSF do material D 0,5 % em batelada e em batelada alimentada..... | 42 |
| Figura 5.8: Concentração máxima de etanol e respectivas produtividades volumétricas encontradas nas sacarificações e fermentações simultâneas, onde: A (ND), B (D 0,5 %), C (D 1 %), D (D 0,5 % - batelada) e E (D 0,5 % - batelada alimentada)..... | 43 |
| Figura 5.9: Aumento da produção de etanol em batelada alimentada (E) em relação às demais Sacarificações e fermentações simultâneas: A (ND), B (D 0,5%), C (D 1 %), D (D 0,5% - batelada)..... | 44 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 4.1 Equações utilizadas para a análise da variância..... | 33 |
| Tabela 5.1: Celulose, hemicelulose e lignina nos materiais sem (ND) e com deslignificação..... | 34 |
| Tabela 5.2: Produtividades (Q_P), rendimentos ($Y_{P/S}$) e eficiências (Ef) nas SSF dos materiais deslignificados..... | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------|---|
| ANP | Agência Nacional de Petróleo |
| ANOVA | Análise de Variância |
| CBU | Unidade de Celobiose |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CONAB | Companhia Nacional de Abastecimento |
| Cc | Conversão de celulose |
| D | Bagaço deslignificado |
| ECC | Conversão de celulose em etanol |
| FPU | Unidade de Papel de Filtro |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MME | Ministério de Minas e Energia |
| ND | Não-deslignificado |
| Proálcool | Programa Nacional do Álcool |
| SSF | Sacarificação e Fermentação Simultâneas |
| SHF | Hidrólise e Fermentação Separadas |
| UNICA | União da Indústria de Cana-de-açúcar |

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento gradual no preço do petróleo, determinado pela redução da oferta prevista para médio e longo prazo. Além disso, o aquecimento global, ocasionado pelo acúmulo de gases do efeito estufa na atmosfera, é uma realidade que impulsiona o desenvolvimento de processos industriais à base de matérias-primas renováveis. Seguindo a tendência mundial, a indústria sucroalcooleira brasileira tem manifestado interesse em tecnologias sustentáveis que possam ser agregadas à sua cadeia produtiva (Pinto, 2010). O etanol tem se mostrado uma das melhores alternativas para redução do uso de combustíveis derivados do petróleo, o Brasil se destaca mundialmente pelo pioneirismo na produção deste combustível a partir do caldo de cana-de-açúcar (Oliveira, 2010). Dentro deste contexto, a importância do desenvolvimento e melhoria das tecnologias para a produção de combustíveis renováveis, tais como etanol, vem sendo aprimorado (Ferreira-leitão *et al.*, 2010).

A crescente demanda pelo etanol produzido a partir da fermentação da sacarose, dito de primeira geração, depende da expansão das plantações de cana-de-açúcar e no aumento em paralelo do número de destilarias. Contudo, no futuro próximo, espera-se que parte desta produção seja feita a partir de biomassa da cana (bagaço e palha). Esta matéria-prima é vantajosa devido à suas quantidades excedentes nas usinas e mais importante, porque eles são estrategicamente localizados perto das unidades produtoras de açúcar e etanol. Ainda, a utilização desses resíduos não é prejudicada pela exigência de terras aráveis para produção de alimentos e pasto (Ferreira-leitão *et al.*, 2010).

As biomassas lignocelulósicas, como o bagaço de cana-de-açúcar, são as fontes de carboidratos mais abundantes na natureza, participando em aproximadamente 50 % de toda biomassa terrestre. O termo **estrutura lignocelulósica** está relacionado à parte do vegetal que forma a parede celular. Geralmente, estão disponíveis sob a forma de resíduos agrícolas, agroindustriais, resíduos urbanos e madeiras. A composição básica do material lignocelulósico depende do vegetal de origem, da espécie da planta, da região de cultivo, idade, período da colheita do material, entre outros fatores (CGEE,

2010). Constitui um material complexo, cuja estrutura é principalmente representada pela interação físico-química da celulose, um polímero linear de glicose, da hemicelulose, heteropolímero altamente ramificado de açúcares, e da lignina, macromolécula com elevado peso molecular e de constituição aromática.

Para a eficiente conversão dessa biomassa em etanol, alguns passos devem ser compreendidos, tais como: pré-tratamento, hidrólise das cadeias polissacarídicas, fermentação dos açúcares, e finalmente, a recuperação e purificação do produto. A tarefa de hidrolisar a lignocelulose em monossacarídeos fermentescíveis é ainda tecnicamente problemática, porque a digestibilidade da celulose é dificultada por muitos fatores físico-químicos, estrutural e composicional. Devido a estas características, o pré-tratamento é um passo essencial para a obtenção desses açúcares. O objetivo dos pré-tratamentos são essencialmente, retirar a hemicelulose (quando se quer trabalhar com a celulose), quebrar a estrutura da lignina e desestruturar a fração cristalina da celulose para favorecer a acessibilidade das enzimas através da hidrólise enzimática (Mosier *et al.*, 2005).

As investigações de pré-tratamentos de biomassa apresentam-se amplamente desenvolvidas. Logo, a necessidade dos produtos a serem obtidos é que direcionará o mecanismo reacional a ser empregado para o melhor aproveitamento da matéria-prima. Uma vez que diferentes materiais lignocelulósicos têm diferentes propriedades físico-químicas, é necessário adotar tecnologias adequadas de pré-tratamentos baseados nas propriedades de cada matéria-prima. Além disso, a escolha de certos pré-tratamentos tem um grande impacto em todas as etapas subsequentes, em termos de digestibilidade da celulose, geração de compostos tóxicos potencialmente inibitórios para fermentação, e demanda de energia no processo (Alvira *et al.*, 2010; Cristofolletti, 2010).

O pré-tratamento por explosão a vapor tem sido largamente aplicado no tratamento de materiais lignocelulósicos, tais como os resíduos agroindustriais. Tem por finalidade, promover a hidrólise dos polissacarídeos, principalmente da hemicelulose e a degradação parcial da lignina. Uma etapa opcional e posterior ao pré-tratamento por explosão a vapor é a deslignificação alcalina,

que tem por finalidade retirar grande parte da lignina presente no complexo e expor ainda mais a celulose ao ataque enzimático. O reagente químico que tem sido mais utilizado no processo de deslignificação é o hidróxido de sódio, onde as condições como concentração de soda e tempo de exposição, são os principais fatores que interferem no rendimento do produto final (Cristofoletti, 2010; Alvira *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2009).

Após a etapa de pré-tratamento, que pode incluir ou não a deslignificação, a hidrólise enzimática da celulose é realizada por um conjunto de enzimas celulolíticas, composto de uma mistura de endo- β -1,4-glucanhidrolases, exo- β -1,4-glucancellobiohidrolases e β -glucosidase. As celulasas quebram a celulose em celobiose, que subsequentemente é clivada em glicose pela β -glucosidase. As celulasas e a β -glucosidase são inibidas pelos seus produtos finais, diminuindo a eficiência da hidrólise (Palmqvist & Hahn-Hagerdal, 2000).

Para evitar a inibição pela glicose, uma estratégia adequada é realizar a hidrólise enzimática simultaneamente com a fermentação, a qual é denominada de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF). Este processo evita a inibição, pois à medida que a glicose é formada, também é consumida para a produção de etanol, levando a uma maior conversão da celulose (Martín *et al.*, 2008; Olofsson *et al.*, 2008).

A sacarificação e fermentação simultânea pode ser realizada em batelada simples ou alimentada. A batelada alimentada foi proposta para aumentar a produção de etanol através da adição gradual de substrato ao processo e, assim diminuir o gasto de energia na etapa de destilação. As condições no tempo de adição e concentração de substrato são fatores que devem ser estudados e otimizados quando se planeja aumentar o rendimento em etanol (Rudolf *et al.*, 2005).

2. OBJETIVOS

Geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o efeito do teor de lignina no bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado por explosão a vapor, após deslignificação alcalina com hidróxido de sódio, na produção de etanol por sacarificação e fermentação simultânea.

Específicos

- Deslignificar o bagaço de cana-de-açúcar com 0,5 e 1 % de NaOH para comparar a produção de etanol entre estes materiais e o material não deslignificado;
- Caracterizar quimicamente o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor com e sem deslignificação para conhecer os teores de celulose, hemicelulose e lignina nestes materiais;
- Selecionar o material que apresentar melhor conversão de celulose em etanol durante sacarificação e fermentação simultânea do bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado por explosão a vapor, com e sem deslignificação;
- Realizar sacarificação e fermentação simultânea em batelada alimentada do material selecionado para aumentar a produção de etanol.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção de Etanol na Matriz Energética Brasileira

O interesse pela utilização e transformação do caldo de cana-de-açúcar em álcool, para movimentação de veículos, remonta o período bem anterior à década de 1970. No início da década de 1920, foram feitas as primeiras tentativas de usar o álcool como combustível. Entre as décadas de 1950 e 1970, esse combustível perde importância no mercado nacional graças à disponibilidade e ao baixo preço do petróleo e seus derivados. Só a partir de 1973 essa situação se altera, com a mudança do cenário internacional, promovido pelo primeiro choque do petróleo, exigindo políticas alternativas e substitutivas de energia (Jimenes-Flores *et al.*, 2010).

Em 14 de novembro de 1975, o presidente Ernesto Geisel, diante da crise energética decorrente da alta do petróleo, busca alternativas e, pelo decreto nº 76.593, cria o Programa Nacional do Álcool ou Proálcool. Seu objetivo era estimular a produção do álcool, visando o atendimento das necessidades do mercado interno e externo e da política de combustíveis automotivos. Devido à iniciativa, houve então a expansão da oferta de matérias-primas, com especial ênfase no aumento da produção agrícola, modernização e ampliação das destilarias existentes e da instalação de novas unidades produtoras, anexa a usinas ou autônomas, e de unidades armazenadoras (Vasconcelos, 2010).

Neste programa, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) foi consolidada como a matéria-prima ideal para produção de etanol e, como consequência, estudos no âmbito tecnológico e agrícolas foram intensificados, levando o Brasil a uma posição favorável em termos de seguridade energética (Soccol *et al.*, 2010).

De acordo com o Ministério de Minas e Energia, o Brasil deverá atingir o consumo de cerca de 65 bilhões de litros de etanol em 2020, o que representa acréscimo de 10,5 % ao ano. Para chegar aos 65 bilhões de litros, é fundamental que o setor sucroenergético siga investindo na renovação de canaviais, na ampliação da produção, seja por meio de novas usinas ou

elevando a capacidade instalada das unidades já existentes e, em especial, em inovação tecnológica (UNICA, 2012).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2012), a quantidade total de cana moída na safra 2011/2012 foi cerca de 571.471 milhões de toneladas. Para a produção de etanol, foram esmagadas cerca de 287,6 milhões de toneladas, que produziu 22.857,6 bilhões de litros. A Figura 3.1, apresenta um gráfico da produção de etanol do setor sucroenergético brasileiro, durante os períodos das safras 2010/2011 e 2011/2012, que ocorre entre os meses de abril a novembro. A produção de etanol hidratado é maior devido ao destino final deste produto, que é empregado na indústria farmacêutica, alcoolquímica e de bebidas. Assim como, sua utilização como combustível automotivo.

Os dados do gráfico foram segundo a fonte do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Agência Nacional de Petróleo (ANP) e elaborado pelo Ministério de Minas e Energia (MME).

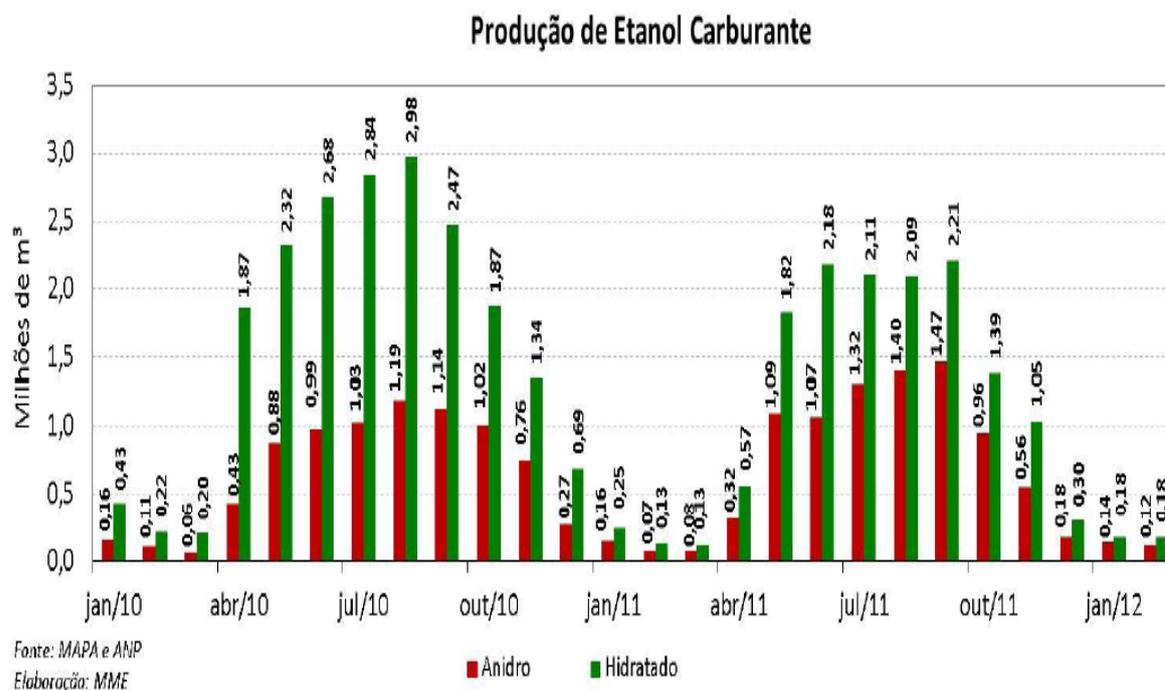


Figura 3.1: Produção de etanol carburante durante as safras 2010/2011 e 2011/2012 (CONAB, 2012).

Atualmente, o etanol é obtido da fermentação de uma variedade de fontes de biomassa, tais como material rico em amido, como milho e trigo, ou de sacarose, como a cana-de-açúcar (Brethauer & Wyman, 2010). Para se produzir o etanol a partir da cana-de-açúcar, é essencial um trabalho conjunto entre a lavoura e a indústria, de forma bem planejada nas etapas de corte, escolha de variedades adequadas, com maiores teores de açúcares e o processamento quase imediato para evitar deterioração e perdas de açúcar. A sacarose é produzida e armazenada pela própria planta, cabendo à indústria realizar sua extração e purificação e, no caso do álcool, sua transformação (Amorim, 2005).

O etanol está em expansão por ser um combustível ainda barato, renovável e cujo emprego como alternativa para a matriz energética mundial está em fase de crescimento. A tendência do aumento da produção de etanol no Brasil ocorre por vários fatores, como o aumento da frota de carros bicomustíveis (demanda interna), Protocolo de Kyoto (demanda externa) e aumento do preço do petróleo (Oliveira, 2010).

3.2 O Bagaço de Cana-de-açúcar como Fonte Alternativa de Matéria-prima

O bagaço de cana-de-açúcar proveniente do processo de extração da sacarose da cana-de-açúcar é um material lignocelulósico e abundante fonte renovável de carbono. O Brasil é o maior produtor mundial de açúcar e álcool a partir da cana-de-açúcar e esta indústria gera uma grande quantidade de resíduos sólidos (palha e bagaço). As primeiras ideias de utilização do bagaço de cana foram como combustível para geração de vapor atendendo à necessidade de aproveitar esse resíduo industrial. Esforços estão atualmente sendo direcionados para incluir também a palha (deixada no campo) no ciclo de produção (Christofolletti, 2010).

O processo de cogeração de energia no setor sucroalcooleiro consiste em aproveitar o vapor produzido (energia térmica) pela queima do bagaço em caldeiras, para movimentar os equipamentos da própria unidade industrial e, simultaneamente, acionar conjuntos geradores de energia elétrica (Christofolletti, 2010).

Contudo, nos recentes anos, tem havido uma tendência crescente para utilização dos resíduos agroindustriais como fonte de matéria-prima para produção de etanol. E um dos mais utilizados tem sido o bagaço de cana-de-açúcar. Durante a safra 2011/2012, mais de 571.471 milhões de toneladas de cana-de-açúcar foram moídas e geraram cerca de 142,86 milhões de toneladas de bagaço (CONAB, 2012).

Mesmo com a queima de grande parcela desses resíduos nas usinas sucroalcooleiras, o excedente ainda é bastante significativo. Isso permitirá que o bagaço seja utilizado para a produção de etanol (segunda geração) e de outros insumos renováveis através de rotas baseadas na alcoolquímica e na sucroquímica, gerando benefícios econômicos, sociais e ambientais (Canilha *et al.*, 2011).

Outras formas de resíduos são os das indústrias de papel e celulose que empregam a madeira como fonte de fibra vegetal. Esse emprego é favorecido nas regiões onde há grandes extensões de reflorestamento, enquanto nas regiões onde predomina a agricultura ocorre uma maior utilização de fibras provenientes de resíduos agrícolas, como o bagaço de cana-de-açúcar (Christofolletti, 2010).

O interesse pelo desenvolvimento de tecnologias para produção do etanol de bagaço tem aumentado devido à sua utilização como combustível, mas ainda é considerado um desafio (Ferreira-Leitão *et al.*, 2010; Martín *et al.*, 2007). A comercialização plena do etanol celulósico vai demorar alguns anos, mas sua promessa de dobrar a produtividade dos produtores brasileiros de etanol de cana-de-açúcar é mais um sinal positivo em um setor cujo potencial de gerar energia limpa abundante é virtualmente impossível de ser equiparado por qualquer outra fonte de combustíveis (UNICA, 2012).

O fator limitante é que simplesmente ainda não há tecnologias de processamento de baixo custo para converter de forma eficiente uma fração significativa da energia contida na biomassa lignocelulósica em combustíveis líquidos (Pinto, 2010).

O material lignocelulósico é um termo genérico para descrever os constituintes principais dos vegetais, ou seja, a celulose, a hemicelulose e a lignina, cuja composição depende não apenas do tipo de vegetal, mas também

de condições de crescimento, de parte da planta escolhida, da idade de colheita, dentre outros fatores (Ogeda & Petri, 2010). O bagaço de cana-de-açúcar é composto principalmente por celulose (40-50%), hemicelulose (30-35%), lignina (20-30%), cinza (3,22-5,5%), enxofre (0,10-0,15%), potássio (0,73-0,97%) (Banerjee & Pandey, 2002).

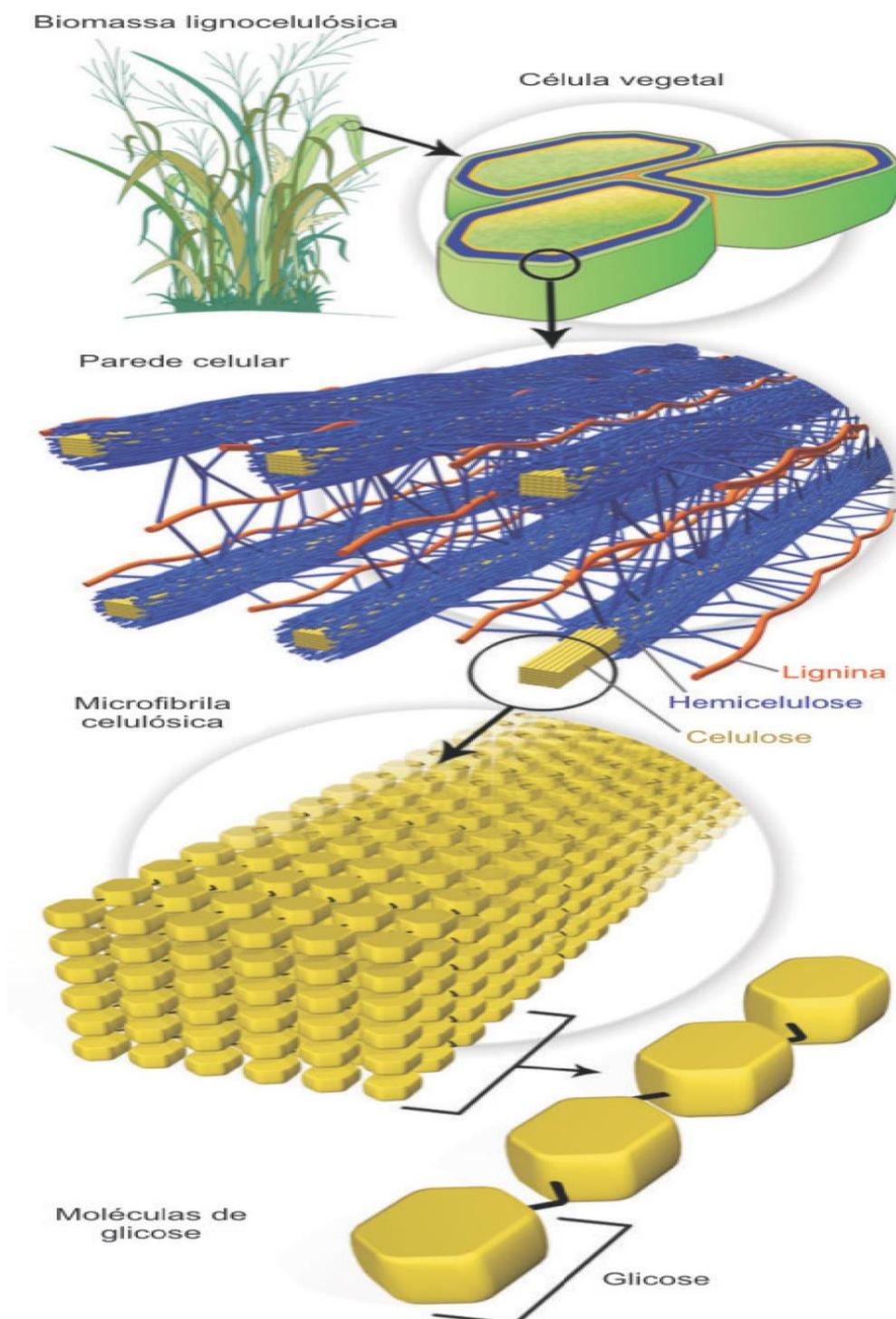


Figura 3.2: Arquitetura da parede celular vegetal (Kondo, 1997).

3.3 Composição Química dos Materiais Lignocelulósicos

A celulose, constituinte mais abundante da parede celular vegetal, é um homopolissacarídeo constituído por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. Internamente, as fibrilas da fração celulósica, encontram-se dispostas linearmente, de forma a conferir força e flexibilidade ao material. Sob condições normais, a celulose é extremamente insolúvel em água, o que é necessário para sua própria função como sustentação estrutural nas paredes celulares vegetais (Castro & Pereira, 2010; Canilha *et al.*, 2011).

Ainda que a celulose funcione como o componente rígido e sustentador de peso da parede celular, a rigidez da microfibrila celulósica é reforçada dentro de uma matriz de hemicelulose (Ojeda & Petri, 2010). Na Figura 3.3, apresenta-se a estrutura química da celulose, que possui a celobiose como unidade repetitiva.

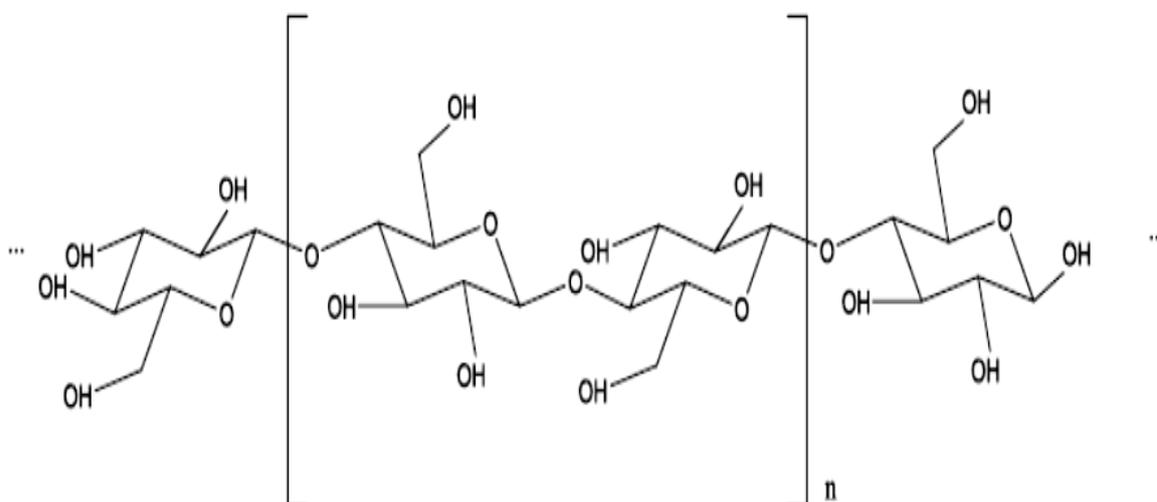


Figura 3.3: Estrutura química da celulose (Castro & Pereira, 2010).

A hemicelulose consiste em um heteropolissacarídeo composto por D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico (Figura 3.4). A hemicelulose atua como um elo químico entre a celulose e a lignina e a totalidade celulose-hemicelulose e

lignina garante maior rigidez à parede celular da planta. (Hendriks & Zeeman, 2009).

Acredita-se que a hemicelulose esteja envolvida na regulação da alongação e modificação da parede, e que as interações entre hemicelulose e as microfibrilas de celulose sejam mais fortes do que as interações entre a hemicelulose e a lignina. A composição química e as características estruturais da hemicelulose variam amplamente através de espécies e estágios de desenvolvimento das plantas (Ojeda & Petri, 2010).

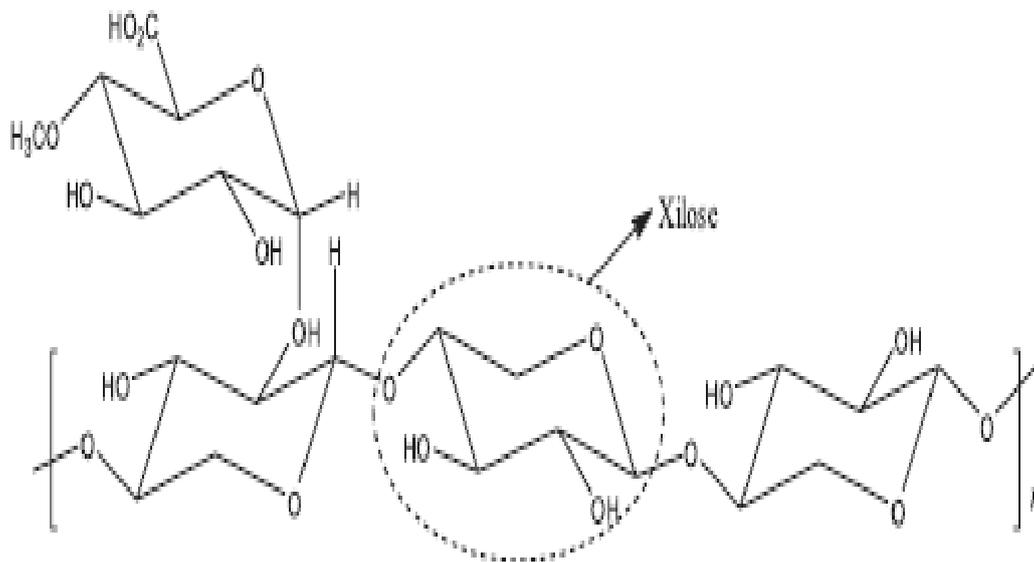


Figura 3.4: Representação esquemática da hemicelulose (Santos *et al.*, 2012a).

A lignina é uma macromolécula (Figura 3.5), formada principalmente pela polimerização radicalar de unidades fenil-propano (álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico). Constitui a fração não polissacarídica mais abundante da lignocelulose. Envolve as microfibrilas celulósicas, conferindo proteção à degradação química e/ou biológica, e pode formar ligações covalentes com a hemicelulose (Canilha *et al.*, 2011). A aplicação de transformações físico-químicas na lignina, permite gerar insumos de interesse

industrial como vanilina, ácido gálico, óleos, fenol, entre outros (Saliba *et al.*, 2001).

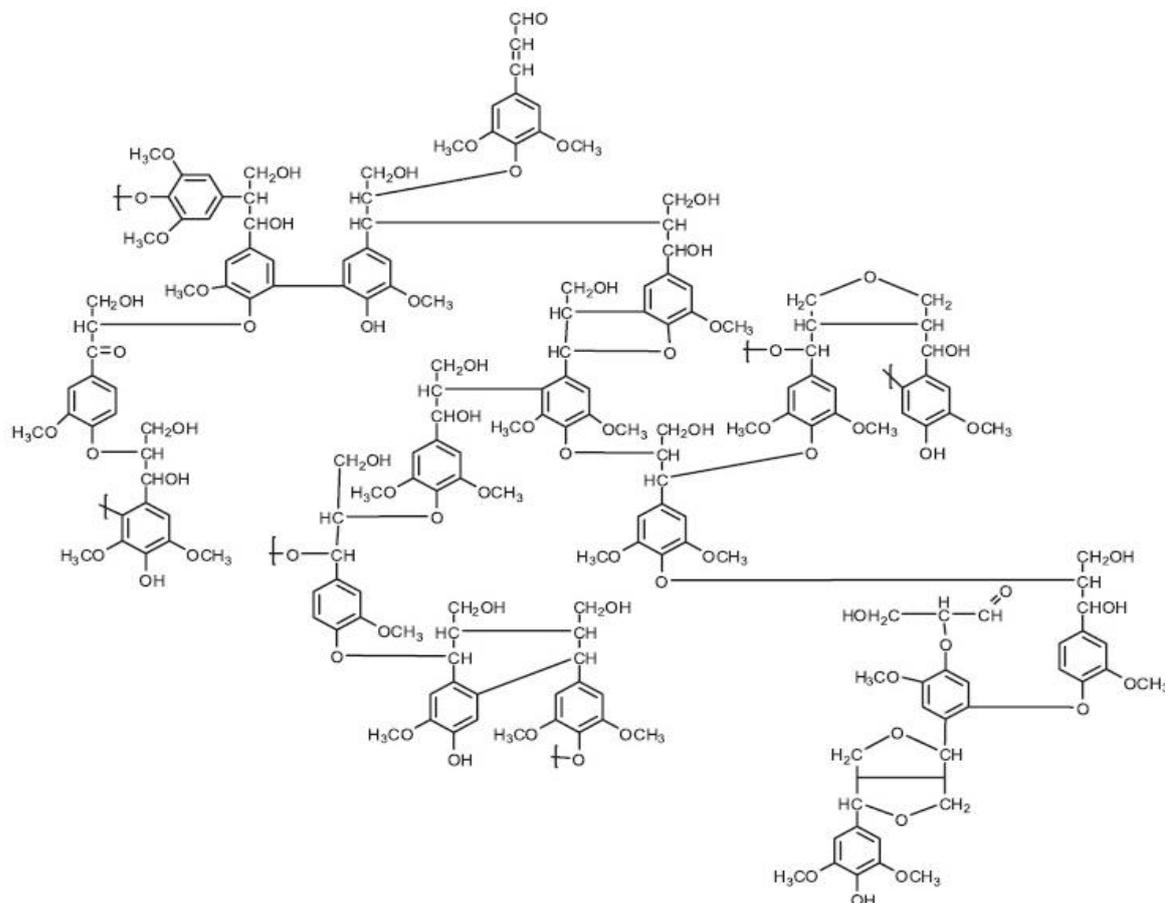


Figura 3.5: Representação esquemática da lignina de eucalipto *Eucalyptus grandis* (Piló-Veloso *et al.*, 1993).

3.4 Pré-tratamento por Explosão a Vapor e Deslignificação Alcalina da Biomassa Vegetal

Do ponto de vista tecnológico, os açúcares contidos na fração celulósica (glicose) e hemicelulósica (xilose, arabinose, glicose, manose e galactose) representam os substratos que podem ser utilizados para a produção de etanol por via fermentativa. Entretanto, conforme ilustrado na Figura 3.2, a íntima associação entre as três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina) é tal que impõe dificuldades para a recuperação dos açúcares constituintes na forma de monômeros com elevado grau de pureza. A partir disso, vários

tratamentos são propostos para desestruturar os componentes da biomassa em seus açúcares constituintes. O conceito geral envolve pré-tratar a matéria bruta para, então, submetê-la à hidrólise enzimática e posterior fermentação para produção de etanol (Figura 3.6) (Sun & Cheng, 2002; Canilha *et al.*, 2010; CGEE, 2010).

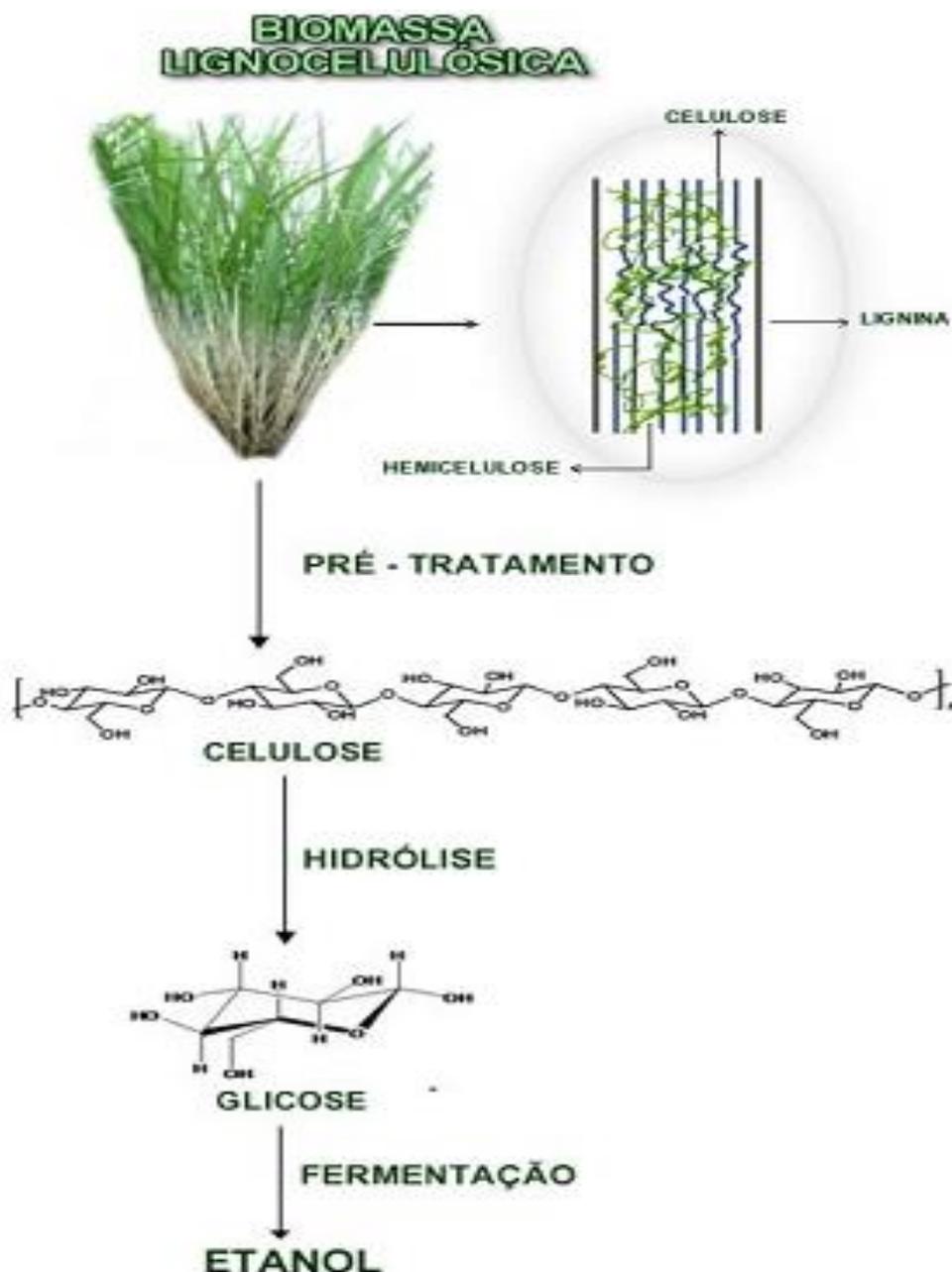


Figura 3.6: Representação esquemática geral da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (Santos *et al.*, 2012a).

Os principais requisitos para um pré-tratamento eficiente são: (A) aumentar a liberação de açúcares ou a habilidade para subsequente hidrólise enzimática; (B) evitar a degradação ou perda de carboidratos; (C) evitar a formação de subprodutos inibitórios para uma posterior hidrólise ou fermentação e (D) ter um baixo custo efetivo. O pré-tratamento pode ser físico (moagem da biomassa, aplicação de radiação), químico (hidrotérmico, oxidação úmida, em meio ácido ou básico), biológico (microrganismos decompositores de madeira) ou a combinação desses (Sun & Cheng; Galbe & Zanchi, 2002).

Uma das tecnologias de pré-tratamentos mais amplamente difundida é a explosão a vapor, que tem sido aplicada com sucesso em vários tipos de biomassa celulósica (madeiras macias e duras, além de resíduos agrícolas). Esse processo pode ocorrer com ou sem a presença de catalisadores químicos (ácido sulfúrico, dióxido de enxofre, e amônia). A operação se dá a altas temperaturas (160-260°C) e pressão, durante certo período de tempo (de alguns segundos até vários minutos), seguindo-se de uma rápida redução da pressão, o que permite que os materiais sofram uma explosão por descompressão (Sun & Cheng, 2002; Ojeda & Petri, 2010).

Quando não existe adição de catalisador, o pré-tratamento a vapor é conduzido por auto-hidrólise e a clivagem das ligações glicosídicas é realizada principalmente pelos catalisadores ácidos da própria biomassa. Embora o ácido acético, considerado o principal catalisador em auto-hidrólises, liberado a partir de acetilados da hemicelulose, outros ácidos tais como os ácidos fórmicos e levulínicos também são produzidos e podem efetuar um papel importante na eficiência do pré-tratamento. Este processo tem sido comparado a outros métodos usados no pré-tratamento de resíduos de madeira, como irradiação por micro-ondas, trituração, hidrólise com ácido diluído ou amônia, no qual demonstrou ser mais eficiente. Enfatizando, que dentre esses tratamentos, o pré-tratamento por explosão a vapor se destaca por ter menor efeito na degradação dos açúcares em compostos inibitórios (Ramos, 2003).

A Figura 3.7 apresenta os produtos gerados no pré-tratamento por explosão a vapor no material lignocelulósico.

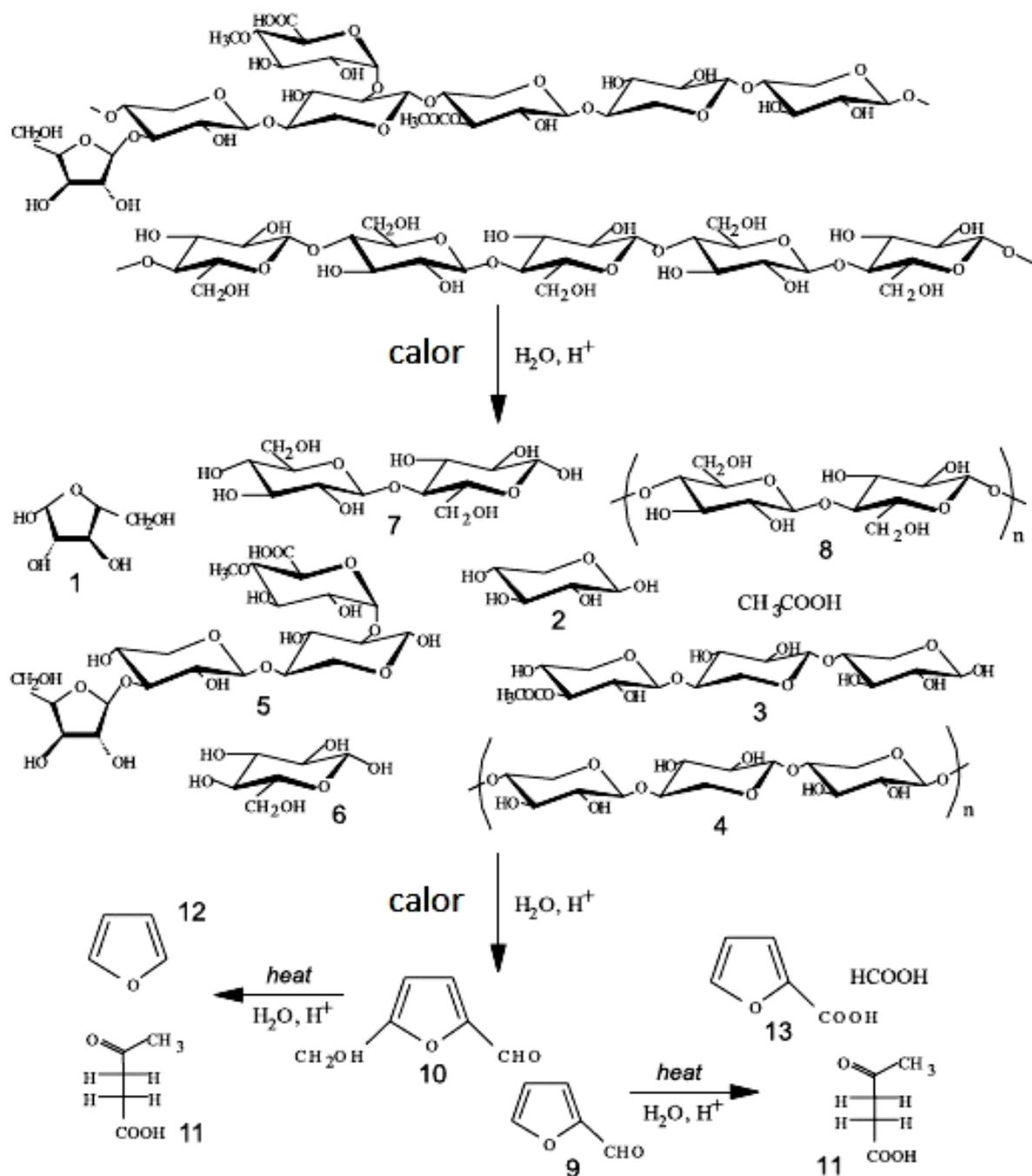


Figura 3.7: Hidrólise de 4-O-metil-glucuranoxilana e celulose. (1) Arabinose, (2) Xilose, (3) Xilooligômeros acetilados, (4) Xilooligômeros de grande massa molecular, (5) Oligossacarídeos, (6) Glicose, (7) Celobiose, (8) Celooligômeros, (9) Furfural, (10) Hidroximetilfurfural, (11) Ácido levulínico, (12) Furano e (13) Ácido furanóico. (Adaptado de Ramos, 2003).

Algumas limitações no pré-tratamento por explosão a vapor incluem a, ruptura incompleta da matriz carboidrato-lignina, e geração de compostos que podem ser inibitórios (furfural e hidroximetilfurfural) para a etapa de fermentação. Devido à formação de produtos de degradação, a biomassa pré-tratada pode ser lavada com água para a remoção dos compostos residuais. A lavagem diminui o rendimento da sacarificação devido à remoção dos açúcares solúveis, como aqueles que são gerados da hidrólise da hemicelulose. Tipicamente, 20-25% do conteúdo inicial da matéria seca é perdida na água de lavagem (Sun & Chen, 2002).

No pré-tratamento a vapor, a recuperação dos açúcares da hemicelulose é alta, embora a hemicelulose residual dificulte o acesso da enzima à celulose (Hsu, 1996). Com a solubilização e hidrólise parcial da hemicelulose, a lignina presente no resíduo é redistribuída e uma fração deste material também é removida. O efeito do tratamento por explosão a vapor sobre a organização estrutural da celulose aumenta consideravelmente sua área superficial e, por conseguinte, a susceptibilidade à hidrólise enzimática (Pan *et al.*, 2005; Ohgren *et al.*, 2007).

Uma etapa adicional ao pré-tratamento por explosão a vapor é a deslignificação, que tem por finalidade retirar a fração da lignina presente no complexo lignocelulósico e expor ainda mais a celulose ao ataque enzimático. Hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amônia são agentes de pré-tratamentos mais adequados para uso. Destes quatro, o hidróxido de sódio é o que tem sido mais utilizado (Kumar *et al.*, 2009). O tratamento com NaOH causa inchaço do material, levando ao aumento da área de superficial, diminuição no grau de polimerização da celulose, diminuição no grau de celulose cristalina, separação das ligações estruturais entre lignina e carboidratos, e quebra da estrutura da lignina (Fan *et al.*, 1987).

3.5 Hidrólise Enzimática e Fermentação do Bagaço de Cana-de-açúcar

Após a etapa de pré-tratamento, que pode incluir ou não a deslignificação, a hidrólise enzimática da celulose é realizada por um conjunto de enzimas celulolíticas, composto de uma mistura de endo- β -1,4-glucanases,

exo- β -1,4-glucanases (EGs) e β -glucosidase (BGs) (Palmqvist & Hahn-Hagerdal, 2000).

Estas enzimas atuam em diferentes sítios da cadeia celulósica de forma sinérgica (Figura 3.8): as exo-glucanases, também conhecidas como celobiohidrolases, atuam clivando ligações glicosídicas nas extremidades da cadeia, obtendo-se as unidades de celobiose; as endo-glucanases clivam regiões amorfas internas da cadeia celulósica e as β -glucosidases clivam a celobiose em unidades de glicose (Galbe & Zacchi, 2002).

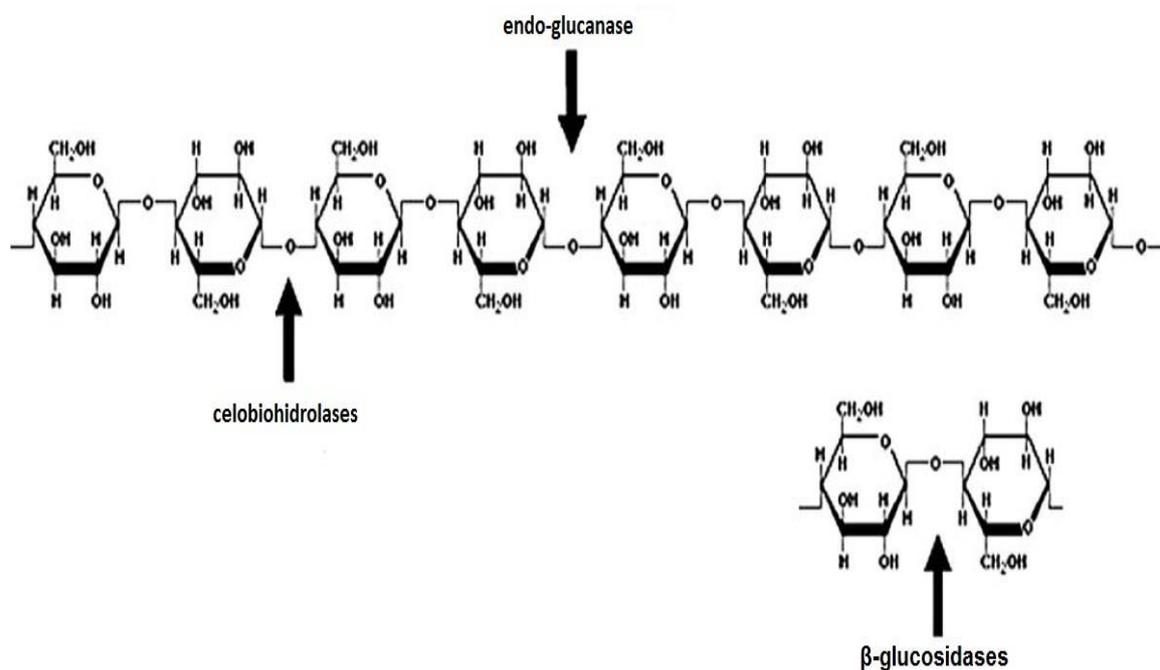


Figura 3.8: Esquema ilustrativo da atuação das enzimas celulolíticas nas cadeias de celulose (Adaptado de Kumar *et al.*, 2008).

A conversão da celulose presente na biomassa vegetal é influenciada pelas características estruturais do material utilizado. A lignina pode promover intensa adsorção inespecífica das enzimas utilizadas para hidrólise da celulose e/ou da hemicelulose. Isto inclusive impede a reciclagem das enzimas, uma estratégia que tem um grande impacto na viabilidade econômica do processo. A cristalinidade é outro fator estrutural que interfere na conversão enzimática, além de outros fatores tais como a temperatura, pH do meio, tampão de reação e concentração do produto (Canilha *et al.*, 2011; Oliveira, 2010).

Quando a fermentação ocorre sequencialmente à hidrólise a operação é designada de SHF – Hidrólise e Fermentação Separadas. O problema nesta operação é que a glicose e a celobiose permanecem no mesmo meio que as enzimas. Dessa forma, à medida que vai aumentando a concentração da glicose e celobiose, estas podem inibir suas respectivas enzimas catalíticas. As celulases são inibidas pela celobiose, enquanto a β -glicosidase é inibida pela glicose (Palmqvist & Hahn-Hagerdal, 2000).

Para evitar a inibição pela glicose, uma estratégia adequada é realizar a hidrólise enzimática simultaneamente com a fermentação, a qual é denominada de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF), termo descrito primeiramente por Takagi *et al.* (1977). Este processo evita a inibição, pois à medida que a glicose é formada, também é consumida para a produção de etanol, levando a uma maior conversão da celulose (Martín *et al.*, 2008; Olofsson *et al.*, 2008).

Uma das dificuldades deste processo refere-se a diferentes temperaturas ótimas para a hidrólise enzimática (45-50°C) e para fermentação (28-35°C) (Martín *et al.*, 2008; Soccol *et al.*, 2010). Além disso, também é necessário que seja estabelecida uma condição intermediária de agitação, visto que a fermentação alcoólica apresenta maior produção de etanol em condições de anaerobiose (Lima *et al.*, 2001) e a sacarificação é realizada geralmente a 150 rpm (Adsul *et al.*, 2005).

Santos *et al.* (2010a), em fermentações de sacarose para produção de etanol, por quatro linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*, variando a temperatura (30, 37 e 45°C) e a agitação (80 e 150 rpm), obtiveram a maior produção pela linhagem UFPEDA 1238, quando utilizaram 37°C e 80 rpm. Dando continuidade a este trabalho, Santos *et al.* (2012b), em SSF de bagaço de cana-de-açúcar deslignificado com a linhagem UFPEDA 1238, obtiveram maior produção de etanol com as mesmas condições de temperatura e agitação anteriormente selecionadas.

Santos *et al.* (2010b) comparando os processos de SSF e SHF do bagaço de cana-de-açúcar concluíram que o processo de SSF leva um tempo menor de realização (40 horas) comparado com a SHF (72 horas). Além disso, a glicose não necessita ser separada do meio reacional como ocorre com a

etapa da sacarificação em separado, evitando assim a perda de glicose (Wingren *et al.*, 2003).

Aumentar o conteúdo de matéria seca na SSF é uma forma de aumentar a concentração final de etanol. Diante disso, o estudo de SSF em batelada alimentada foi proposto para permitir o aumento na concentração de substrato e consequente aumento na concentração de açúcar no hidrolisado, elevando a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, minimizando a energia de consumo e perdas durante a evaporação e destilação (Wingren *et al.*, 2003; Rudolf *et al.*, 2005). Além disso, a batelada alimentada promove a redução de problemas de mistura e transferência de calor devido às propriedades reológicas da suspensão fibrosa bastante densa (Rudolf *et al.*, 2005), uma vez que o substrato é adicionado gradualmente, à medida que é consumido, o que mantém a viscosidade da reação num nível baixo (Chen *et al.*, 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bagaço de cana-de-açúcar

Foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor a 200°C, por 7 minutos, cedido pelo Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia da USP, proveniente da Usina Vale do Rosário em São Paulo. O material (ND – não deslignificado) foi lavado com água destilada aquecida para retirada da hemicelulose que ainda estivesse aderida ao bagaço. As hidrólises enzimáticas e sacarificações e fermentações simultâneas foram realizadas com este material deslignificado ou não.

4.2 Enzimas

Foram usadas preparações comerciais de celulasas (Celluclast 1,5 L) e β -glucosidase (Novozym 188), ambas produzidas pela Novozymes A/S (Bagsværd, Dinamarca). As atividades enzimáticas da Celluclast (69,5 FPU/mL e 13,7 CBU/mL) e da β -glucosidase ($13,4 \times 10^2$ CBU/mL) foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por Ghose (1987). As enzimas foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP).

4.3 Micro-organismo

Foi utilizada a linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238, pertencente à Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE.

4.4 Meios de Cultura

O meio de cultura utilizado para a conservação, em tubo de ensaio inclinado, foi composto de glicose (20 g/L), extrato de levedura (4 g/L), peptona

(3 g/L) e ágar (15 g/L). Na preparação do inóculo, também foi utilizado à mesma composição de meio, mas sem adição de ágar. O pH foi ajustado para 7,0 em ambos os meios.

As hidrólises enzimáticas e sacarificações e fermentações simultâneas foram realizadas utilizando um meio de cultura contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/L), KH_2PO_4 (2 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,75 g/L) e extrato de levedura (4 g/L). A preparação deste meio foi em tampão citrato de sódio a 50 mM e pH 4,8. A fonte de glicose derivou da celulose presente no bagaço de cana-de-açúcar com e sem deslignificação.

4.5 Preparo do Inóculo

A linhagem de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 foi repicada em tubos de ensaio contendo o meio de conservação (item 4.4), o qual foi mantido em estufa a 30°C durante 24 horas. Após esse período, o inóculo foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio de inóculo (item 4.4), o qual foi submetido a 250 rpm e 30°C, por 12 horas, em mesa incubadora rotativa da New Brunswick Scientific C25KC. Posteriormente, todo o volume de suspensão do frasco de Erlenmeyer, foi filtrado em membrana de 0,45 µm. A biomassa foi resuspendida em 10 mL água destilada estéril e, em seguida, o volume equivalente a 1 g/L foi transferido para o frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de meio de SSF (item 4.4).

4.6 Deslignificação do Bagaço Pré-tratado por Explosão a Vapor

O processo de deslignificação foi realizado em reator do tipo autoclave eletrônica, modelo: AU/E-20, do fabricante REGMED INDÚSTRIA TÉCNICA DE PRECISÃO LTDA. Foram transferidos para o reator, 0,5 Kg de bagaço pré-tratado por explosão a vapor (massa seca) e 10 L de água destilada. A massa de NaOH foi de 50 (D 0,5 %) e de 100 g (D 1 %). A mistura, para a menor concentração de soda (D 0,5 %), permaneceu a 90° C, durante 30 minutos (Oliveira *et al.*, 2011). Enquanto que, a mistura de maior concentração (D 1 %),

permaneceu a 100° C, durante 60 minutos (Santos *et al.*, 2010b). Após o término do tempo reacional, a fração sólida misturada ao licor negro foi transferida para um saco de algodão que funcionou como meio filtrante, sendo posteriormente lavado exaustivamente com água destilada aquecida (~70 °C) para retirada da lignina solúvel residual. Em seguida, todo o bagaço foi espalhado em lona para secagem à temperatura ambiente.

O rendimento da deslignificação (Equação 4.1) relaciona a massa de bagaço seco recuperado ao final do processo e a massa utilizada no início deste, ou seja, o material pré-tratado por explosão a vapor. Cadinhos previamente tarados foram pesados com 3 g de bagaço antes e depois da deslignificação e levados a estufa a 80°C por 4 horas para retirada da umidade.

$$\% \text{ Massa} = \frac{(Mbg_f)}{(Mbg_i)} \cdot 100 \quad \text{Eq. 4.1}$$

Onde:

M_{bgi} - Massa do bagaço seco no início deslignificação (em g)

M_{bgf} – Massa do bagaço seco após a deslignificação (em g)

% Massa – Rendimento da deslignificação

4.7 Caracterização Química do Bagaço de Cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi caracterizado, quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina, segundo a metodologia descrita por Rocha *et al.* (1997) e, recentemente validada por Gouveia *et al.* (2009). Primeiramente, amostras de 2 g (moída a 20 mesh em moinho Wiley) dos bagaços pré-tratados por explosão a vapor sem (ND) e com deslignificação (D 0,5 % e D 1 %), foram transferidas para béqueres de 100 mL e tratadas com 10 mL de H₂SO₄ 72% v/v, sob vigorosa agitação manual, em um banho termostático (Tecnal, modelo TE-2005) a 45° C por 7 min.

Posteriormente, as amostras foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 500 mL, adicionando-se o volume de 275 mL de água destilada. Para a hidrólise dos oligômeros restantes, os frascos foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 min a 121 °C. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados até temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel de filtro quantitativo faixa preta. A fração líquida foi coletada em balão volumétrico de 500 mL, o qual teve o seu volume posteriormente completado com água destilada. A solução foi armazenada para análises posteriores de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural (HMF), por cromatografia líquida de alta eficiência e, a lignina solúvel, por absorvância.

4.7.1 Determinação da lignina solúvel e insolúvel

A lignina insolúvel (Equação 4.2), foi determinada de acordo com o método Klason modificado por Rocha *et al.* (1997). O material retido no papel de filtro foi lavado com 1500 mL de água destilada e transferido para pesafiltros para secagem em estufa a 100°C até peso constante.

$$\%L_{Ki} = \frac{M_K - M_C}{M_A} * 100 \quad \text{Eq.4.2}$$

Onde:

$\%L_{Ki}$ – Lignina Klason insolúvel

M_k – massa de lignina insolúvel seca (em g)

M_C – massa de cinzas (em g)

M_A – massa da amostra de bagaço seca (em g)

A metodologia da quantificação das cinzas é encontrado no item 4.2.5. A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorvância a

280 nm em espectrofotômetro (Femto, modelo 700 plμs). O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a Equação 4.3 (Rocha *et al.*, 2012).

$$C_{lig} = 4,187 * 10^{-2} (A_t - A_{pd}) - 3,279 * 10^{-4} \quad \text{Eq.4.3}$$

Onde:

C_{lig} - concentração de lignina solúvel (em g/L)

A_T - absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm

$A_{pd} = c_1 \varepsilon_1 + c_2 \varepsilon_2$ = absorvância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares em furfural e HMF, cujas concentrações c_1 e c_2 foram determinadas previamente por CLAE e ε_1 e ε_2 são as absorvâncias e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 g/L⁻¹.cm⁻¹.

4.7.2 Determinação do conteúdo de cinzas

Após a determinação da lignina insolúvel, o papel de filtro contendo a amostra seca, foi transferido para um cadinho de porcelana previamente pesado. A amostra foi calcinada lentamente até 300°C e mais 2 horas a 800°C, em uma mufla (FORNITEC, modelo MDS 15X15X30). Na determinação das cinzas totais, foram pesados 2 g dos bagaços com e sem deslignificação, sendo estes não hidrolisados com ácido sulfúrico, em cadinho de porcelana previamente pesado. Por diferença de massa, o teor de cinzas da lignina insolúvel e das cinzas totais foi determinado conforme a Equação 4.4.

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{M_C}{M_A} * 100 \quad \text{Eq. 4.4}$$

Onde:

% Cinzas – percentual em massa de cinzas

M_C – massa de cinzas (em g)

M_A – massa da amostra de bagaço seca (em g)

Antes da determinação de carboidratos e de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência, o hidrolisado foi aplicado em cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak C₁₈ (Phenomenex), num sistema de filtração manifold conectado a uma bomba de vácuo. Para as análises de furfural e de HMF, uma amostra do hidrolisado foi filtrada em membrana de 0,45 µm. Ao determinar carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e HMF, é possível se calcular os teores de celulose e de hemicelulose utilizando os seguintes fatores de conversão (Gouveia *et al.*, 2009): celulose (0,90 x massa de glicose; 0,95 x massa de celobiose; 1,20 x massa de HMF; 3,09 x massa de ácido fórmico); hemicelulose (0,88 x massa de xilose; 0,88 x massa de arabinose; 0,72 x massa de ácido acético; 1,37 x massa de furfural). As condições para determinação dos carboidratos, ácidos orgânicos, hidroximetilfurfural e furfural estão descritos no item 4.2.9.

4.8 Determinação das Atividades Enzimáticas

As determinações das atividades das celulasas (endo e exoglucanases) e β-glucosidase foram realizadas conforme as metodologias propostas por Ghose (1987).

Para as celulasas foram preparados tubos ensaios, controles, brancos e padrões da glicose. Os tubos de ensaios continham 50 mg do substrato (Papel de filtro de celulose Whatman), 1 mL do tampão citrato de sódio (50 mM, pH = 4,8) e 0,5 mL da enzima diluída. Os tubos controles da enzima não continham o substrato e o tubo controle do substrato não continha a enzima. Os tubos padrões da glicose continham 0,5 mL da diluição da glicose e 1 mL do tampão. Foram feitas quatro diluições, em tampão de citrato de sódio, da solução estoque de glicose (3,35 mg/0,5mL; 2,5 mg/0,5 mL; 1,65 mg/0,5 mL; 1,0 mg/0,5 mL). Os tubos foram incubados em banho termostático (Tecnal, modelo TE-2005) a 50°C por 60 min. Após o período de incubação, foram adicionados 3 mL de ácido dinitrossalicílico (DNSA) para interromper a reação enzimática. Para dosar os açúcares redutores, os tubos foram colocados exatamente por 5 min em banho de água fervente. Em seguida, os tubos foram resfriados até

atingir a temperatura ambiente. Antes de proceder à leitura da absorbância no espectrofotômetro (Femto, modelo 700 plµs) a 540 nm, foram adicionados 5 mL de água destilada. A curva de calibração de glicose foi obtida através do gráfico com os valores de absorbância e de concentração de glicose.

Usando a curva de calibração da glicose, foi possível determinar a concentração de glicose liberada em cada reação enzimática. A concentração da enzima foi estimada para exatamente 2 mg de glicose liberada durante a reação enzimática (definição de Filter Paper Unity - FPU), pela equação da reta entre as concentrações de glicose após cada reação e os logaritmos das respectivas diluições da enzima. O cálculo para a atividade celulolítica foi obtido a partir da Equação 4.5.

$$1IU = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ de substrato convertido} = 0,18 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \text{ quando o produto é glicose}$$

A quantidade absoluta de glicose liberada na medida em FPU a uma diluição crítica é 2 mg, assim,

$$2 \text{ mg glicose} = 2 / (0,18 * 0,5 * 60) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = 0,37 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$$

Portanto, a quantidade estimada de enzima, que libera 2 mg de glicose na reação contem 0,37 unidades, é:

$$\text{FPU} = \frac{0,37}{\text{Diluição da enzima que libera 2mg de glicose}} \quad \text{Eq. 4.5}$$

A determinação da atividade da β -glucosidase foi realizada pela quantificação da glicose liberada na reação, utilizando-se celobiose como substrato. As análises de tal enzima foram feitas em duas etapas. Inicialmente foi realizado o ensaio enzimático, o qual consistiu na incubação, em tubos de ensaio, de 1,0 mL das amostras das diluições da enzima, com um 1,0 mL de

uma solução de celobiose a 15 mM (preparada em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8) em banho-maria (Tecnal, modelo TE-2005) a 50°C, durante 30 minutos. Após este período, os tubos foram levados para a água fervente, durante 5 minutos, para interrupção da reação enzimática, sendo logo após, resfriados em banho de gelo.

A segunda etapa consistiu na determinação da concentração de glicose formada no ensaio enzimático. Esta quantificação foi realizada utilizando-se um kit de glicose (GLICOSE PAP Liquiform, da Labtest), o qual contém o reagente GOD-POD composto por um sistema enzimático (*glicose oxidase* e *peroxidase*), responsável pela reação com as moléculas de glicose e formação de compostos de cor vermelha, cuja intensidade é proporcional à concentração deste carboidrato presente. Dessa forma, 30 µL das amostras resultantes dos ensaios enzimáticos foram incubados com 3,0 mL do reagente GOD-POD, em banho-maria (Tecnal, modelo TE-2005) a 37°C, durante 15 minutos. Nas análises também foram preparados tubos controles das enzimas, isto é, sem celobiose.

O kit também contém um padrão composto por glicose a 100 mg/dL, o qual também foi incluído nas análises. Um volume de 30 µL do padrão reagiu com 3,0 mL do reagente GOD-POD, também a 37°C, durante 15 minutos.

Assim, as absorvâncias de todas as amostras foram determinadas em espectrofotômetro (Femto, modelo 700 plµs) a 505 nm. Antes de tais leituras, a absorvância zero do espectrofotômetro foi estabelecida, através da leitura do branco, composto, apenas, do reagente GOD-POD. A concentração da glicose liberada foi estimada pela Equação 4.6:

$$\text{Glicose: } \frac{\text{Absorvância teste}}{\text{Absorvância padrão}} * 100 \quad \text{Eq. 4.6}$$

As absorvâncias do teste foram obtidas subtraindo-se as absorvâncias das amostras resultantes após reações enzimáticas pelas absorvâncias dos controles das enzimas. Os valores de glicose obtidos em mg/dL foram convertidos em mg/mL. Dessa forma, foi possível determinar a concentração

de glicose liberada em cada reação enzimática. A atividade enzimática foi estimada para exatamente 1 mg de glicose liberada durante a reação enzimática (unidade de celobiose, CBU), através da equação da reta entre as concentrações de glicose após cada reação e os logaritmos das respectivas diluições da enzima.

A atividade da β -glucosidase foi estimada pela Equação 4.7. A quantidade absoluta de glicose liberada na medida em CBU a uma diluição crítica é 1 mg, assim, é

$$1 \text{ mg glicose} = 0,5 / (0,18 * 1 * 30) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = 0,0926 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$$

Portanto, a quantidade estimada de enzima, que libera 1 mg de glicose na reação, é:

$$\text{CBU} = \frac{0,0926}{\text{Diluição da enzima que libera 1mg de glicose}} \quad \text{Eq. 4.7}$$

4.9 Sacarificação e Fermentação Simultânea

Foram realizadas as sacarificações e fermentações simultâneas (SSF) em batelada simples e alimentada, em frascos Erlenmeyers de 250 mL, com 8 g de bagaço, 90 mL de tampão citrato de sódio (50 mM e pH 4,8) e preparações comerciais de celulasas e β -glucosidase. As cargas enzimáticas foram 10 FPU/g de celulose e 5 % v/v do volume utilizado da Celluclast sendo de β -glucosidase. A batelada alimentada também iniciou com 8 g de bagaço e foi adicionado 1 g a cada 24 horas, totalizando 12 g ao final das 120 horas do experimento.

Inicialmente, os frascos foram mantidos em mesa incubadora rotativa (TECNAL), a 50 °C e 150 rpm por 6 horas, período denominado de pré-sacarificação. Após este período, a temperatura e agitação foram reduzidas para 37°C e 80 rpm e 10 mL de uma suspensão microbiana foram adicionados, dando-se início à sacarificação e fermentação simultânea propriamente dita. A

concentração inicial de biomassa foi de 1 g/L. Todas as amostras foram centrifugadas (Eppendorf, Minispin) por 10 minutos a 10.000 rpm, sendo os sobrenadantes, filtrados em membrana de 0,45 μm e utilizados para a quantificação de carboidratos, glicerol, etanol e ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.10 Hidrólise Enzimática

Foram realizadas hidrólises enzimáticas sob as mesmas condições de temperatura e de agitação das sacarificações e fermentações simultâneas, isto é, houve uma fase inicial de 6 horas a 50 °C e 150 rpm e, após esse período, a temperatura e agitação foram reduzidas para 37°C e 80 rpm, sem adição da suspensão microbiana. Estas hidrólises foram realizadas para se conhecer os perfis de glicose que seria liberado sob as mesmas condições das sacarificações e fermentações simultâneas. Os experimentos das hidrólises enzimáticas e SSF foram realizados em duplicata.

4.11 Determinação de Carboidratos, Ácidos orgânicos, Etanol, Hidroximetilfurfural e Furfural

As concentrações de carboidratos, ácidos orgânicos e etanol foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo líquido da Agilent HP 1100. As condições foram: coluna HPX-87H⁺, ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel, detecção por índice de refração, vazão de 0,6 mL/min e 50^o C.

A determinação de hidroximetilfurfural e de furfural também foi realizada por CLAE. Foram utilizadas as seguintes condições: coluna C-18 (Beckman), acetonitrila 12 % v/v e ácido acético 88 % v/v como fase móvel, detecção UV em 274 nm, vazão de 0,8 mL/min e 25°C.

4.12 Parâmetros Cinéticos da Fermentação

4.12.1 Rendimento ($Y_{P/S}$)

O coeficiente de rendimento ($Y_{P/S}$) relaciona a produção de etanol com a concentração do substrato (Equação 4.8).

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

Eq.4.8

Onde:

ΔP - ($P_f - P_i$): Variação da concentração de etanol (em g/L)

ΔS - ($S_i - S_f$): Variação da concentração de glicose (em g/L)

4.12.2 Eficiência da fermentação (E_f)

A eficiência fermentativa é calculada pela relação entre o rendimento real do processo e o rendimento teórico definido pela literatura, igual a 0,511 (Equação 4.9).

$$E_f = \frac{(Y_{p/s})_r}{(Y_{p/s})_t} \cdot 100$$

Eq. 4.9

Onde:

$(Y_{P/S})_r$: rendimento real (em g/g)

$(Y_{P/S})_t$: rendimento teórico = 0,511 (em g/g)

4.12.3 Produtividade volumétrica máxima em produto (Q_p)

A produtividade volumétrica foi calculada baseada na concentração máxima de etanol em função do tempo respectivo (Equação 4.10).

$$Q_p = \frac{E_{\max}}{t_{\max}}$$

Eq. 4.10

Onde:

E_{\max} : concentração máxima de etanol (em g/L)

t_{\max} : tempo referente à concentração máxima de etanol (em h)

4.13 Conversão de Celulose em Etanol (ECC)

A conversão enzimática de celulose em etanol (ECC) durante as sacarificações e fermentações simultâneas foi determinada pela Equação 4.11 (Martin *et al.*, 2008):

$$ECC = \frac{E_t - E_i}{C_i \cdot 0,57} \quad \text{Eq. 4.11}$$

Onde:

E_t : concentração de etanol em cada tempo (em g/L)

E_i : concentração inicial de etanol (em g/L)

C_i : concentração inicial de celulose (em g/L)

O fator 0,57 é o rendimento estequiométrico de etanol a partir da celulose.

4.14 Conversão de Celulose em Glicose (C_C)

A conversão enzimática da celulose em glicose durante as hidrólises enzimáticas foi determinada pela equação 4.12:

$$C_C (\%) = \frac{C_G \cdot 0,9}{C_S \cdot T_C} \cdot 100 \quad \text{Eq.4.12}$$

Onde:

C_G : concentração de glicose no hidrolisado enzimático (em g/L)

0,9: fator da conversão de celulose em glicose

C_S : concentração da biomassa lignocelulósica no experimento (em g/L)

T_C : teor de celulose na biomassa lignocelulósica (em %)

4.15 Análise de Variância

Análises de variância, no nível de 95 % de confiança e utilizando o programa Origin 6.0, foram aplicadas para avaliar a significância estatística das conversões de celulose em etanol nas sacarificações e fermentações simultâneas dos materiais deslignificados.

Se não há diferença entre os tratamentos, então a Variância Entre deve ser igual à Variância Dentro e a razão F entre elas é 1. Para testar a significância do valor de F obtido no experimento, isto é, verificar se o valor de F calculado difere de 1 ao acaso ou por efeito dos tratamentos, compara-se este valor com um F tabelado. Este último estipula o limite para uma diferença aleatória entre as variâncias Entre e Dentro. Se F calculado for menor que F tabelado, conclui-se que não há diferença entre os tratamentos, já que a variação observada entre tratamentos é da mesma ordem daquela observada dentro dos tratamentos. Se F calculado for maior do que F tabelado, então há diferença significativa entre os tratamentos.

Para obter o $F_{\text{calculado}}$ utiliza-se a Equação 4.13.

$$F_{\text{calculado}} = \frac{MQ_E}{MQ_D} \quad \text{Eq. 4.13}$$

MQ_E é a Média Quadrática Entre Grupos e MQ_D é a Média Quadrática Dentro dos Grupos. A Tabela 4.1 apresenta todas as equações utilizadas para a análise de variância.

Tabela 4.1 Equações utilizadas para a análise da variância (Callegari-Jacques, 2003).

| Causas de variação | SQ | GL | MQ | F_{calculad} | F_{tabelado} |
|--|--|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>Entre grupos (tratamentos)</i> | $SQ_E = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2$ | $gl_E = k - 1$ | $\frac{SQ_E}{k - 1}$ | $\frac{MQ_E}{MQ_D}$ | F_{α, gl_E, gl_D} |
| <i>Dentro dos grupos (resíduo)</i> | $SQ_D = \sum_{i=1}^k \left[\sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2 \right]$ | $gl_D = (\sum n_i) - k$ | $\frac{SQ_D}{(\sum n_i) - k}$ | | |

SQ – Soma Quadrática, SQ_E – Soma Quadrática Entre Grupos, SQ_D – Soma Quadrática Dentro Grupos, GL – Graus de Liberdade, MQ – Média Quadrática, k – número total de grupos, n_i – número de observações em cada grupo, F_{α, gl_E, gl_D} – Valor do teste F tabelado, $F_{calculado}$ – Valor de F calculado, $F_{tabelado}$ – Valor de F tabelado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Conversão de Celulose em Glicose durante Hidrólises Enzimáticas dos Materiais com Diferentes Teores de Lignina

Inicialmente foram caracterizados os materiais antes e após a deslignificação alcalina. Os teores de celulose, hemicelulose e lignina encontrados nos materiais são apresentados na Tabela 5.1. O maior teor de celulose foi encontrado no material deslignificado com maior percentual de soda (D 1 %), seguido do material deslignificado com 0,5 % (D 0,5 %) e do material não deslignificado (ND).

Tabela 5.1: Celulose, hemicelulose e lignina nos materiais sem (ND) e com deslignificação (D 0,5 % e D 1 %).

| Componente | ND | D 0,5 % | D 1 % |
|------------------|--------------|--------------|--------------|
| Celulose (%) | 45,46 ± 1,39 | 64,79 ± 2,99 | 87,30 ± 2,22 |
| Hemicelulose (%) | 15,33 ± 1,64 | 13,72 ± 0,34 | 6,88 ± 0,69 |
| Lignina (%) | 24,67 ± 0,91 | 11,88 ± 0,55 | 5,68 ± 0,13 |
| Cinzas (%) | 5,46 ± 0,39 | 5,53 ± 0,12 | 3,19 ± 0,31 |

Enquanto o material D 1 % apresentou menor teor de lignina (5,68 %), o que equivale a uma redução de 77% em relação ao material ND, o material D 0,5 % apresentou redução de 52 %. O teor de hemicelulose diminuiu ainda mais após a deslignificação alcalina com 1 % de NaOH. A metade de soda utilizada no material D 0,5 % proporcionou a obtenção do dobro do teor de lignina encontrado no material D 1 %.

Barcelos *et al.* (2012), utilizando 4 % de NaOH, observaram uma remoção de 54 % de lignina em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído e em autoclave. Entretanto, vários trabalhos (Santos *et al.*, 2010b; Santos *et al.*, 2012b; Rocha *et al.*, 2012; Wanderley, 2012) também utilizando 1 % de NaOH, encontraram semelhante remoção de lignina daquela do material D 1 %. Provavelmente a maior remoção observada nestes

trabalhos em relação ao de Barcelos *et al.* (2012) foi a etapa de pré-tratamento por explosão a vapor que antecedeu a deslignificação alcalina. No pré-tratamento por explosão a vapor, ocorre à hidrólise parcial e solubilização da hemicelulose e, a lignina é redistribuída no material (Pan *et al.*, 2005).

A Figura 5.1, apresenta a concentração de glicose e a conversão de celulose durante as hidrólises enzimáticas dos materiais deslignificados (D 0,5 % e D 1 %) com 0,5 % e 1 % de NaOH, variando a temperatura e a agitação (item 4.2.8). Estas hidrólises foram realizadas para se conhecer os perfis das concentrações de glicose liberadas sobre as mesmas condições da sacarificação e fermentação simultânea que foram realizadas posteriormente.

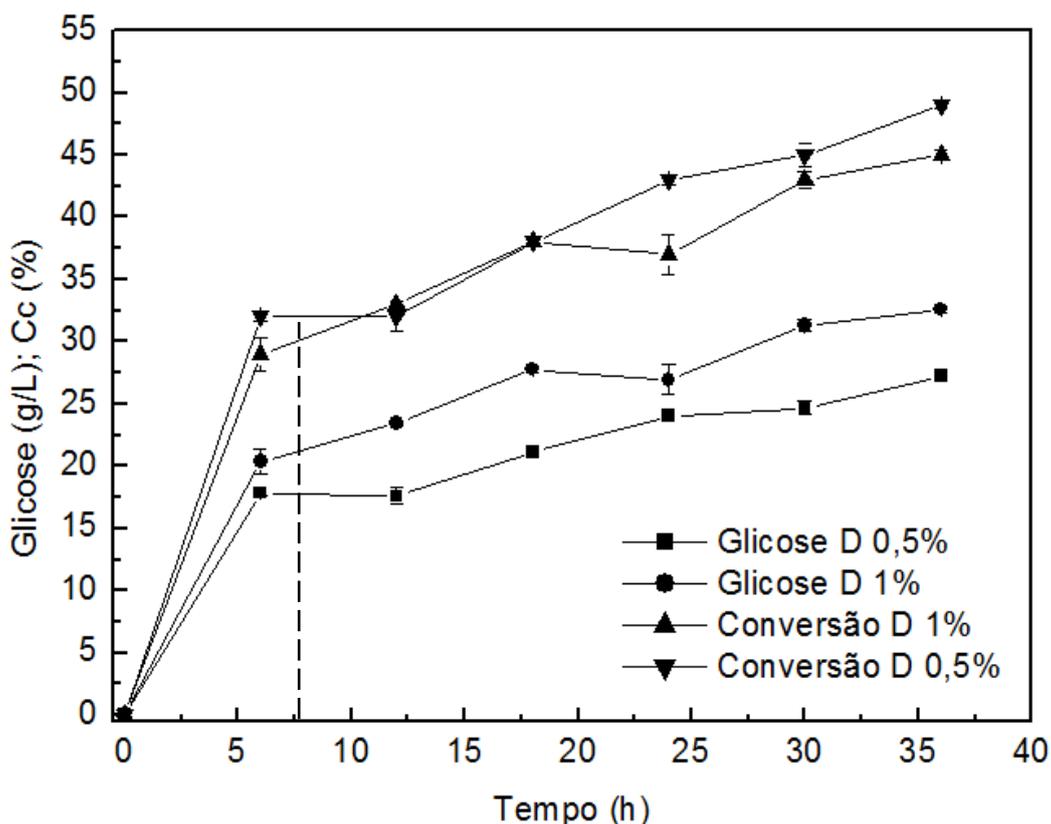


Figura 5.1: Concentração de glicose e conversão de celulose durante as hidrólises enzimáticas dos materiais deslignificados (D 0,5 % e D 1 %). A linha tracejada apresenta o momento da redução da temperatura e da agitação.

As concentrações de glicose nas hidrólises destes materiais, com 36 horas, foram 27,2 e 32,5 g/L para D 0,5 % e D 1 %, respectivamente. A diferença na concentração de glicose entre os materiais deslignificados foi de

15 % após 30 horas, com a maior concentração alcançada na hidrólise do material D 1 %, uma vez que este continha maior teor de celulose (Tabela 5.1). Na hidrólise enzimática do material D 1 %, mas sem redução da temperatura ou da agitação, a concentração de glicose com 36 horas foi 39,4 g/L (Wanderley, 2012). A mudança da temperatura e da agitação provocou uma redução de 17,5 % na concentração de glicose em comparação a Wanderley (2012). Isto ocorreu, pois as condições ótimas de temperatura e agitação para a sacarificação são 45-50 °C e 150 rpm, respectivamente (Adsul *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2008).

A conversão de celulose em glicose foi semelhante durante todo o processo, apesar do teor de lignina no material D 0,5 % ser o dobro daquele encontrado no material D 1 %. As máximas conversões alcançadas foram 49 e 45 % na hidrólise do material D 0,5 % e D 1 %, respectivamente.

Barcelos *et al.* (2012), na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido diluído em autoclave e com posterior deslignificação com 4 % de NaOH, mas sem variar a temperatura e a agitação, observaram uma conversão de 50 %. A semelhante conversão (49 e 45 %) obtida no presente trabalho com materiais deslignificados com menores teores de soda (D 0,5 % e D 1 %) foi provavelmente devido ao pré-tratamento por explosão a vapor, antes da deslignificação, que redistribuiu a lignina e aumentou a área superficial do material, facilitando a hidrólise enzimática (Pan *et al.*, 2005).

5.2 Conversão de Celulose em Etanol durante as SSF dos Materiais com Diferentes Teores de Lignina

Após as hidrólises enzimáticas dos materiais com diferentes teores de lignina sobre as condições de temperatura e de agitação que são utilizadas na SSF, deu-se prosseguimento ao estudo, com a realização de sacarificações e fermentações simultâneas com os três bagaços (ND, D 0,5 % e D 1 %). Na Figura 5.2, as concentrações iniciais de glicose, que corresponde ao ponto zero no gráfico, foram alcançadas a partir da etapa de pré-sacarificação a 50 °C e

150 rpm, durante 6 horas. Neste ponto, foram reduzidas as condições para 37°C e 80 rpm, respectivamente, além de adicionado o inoculo.

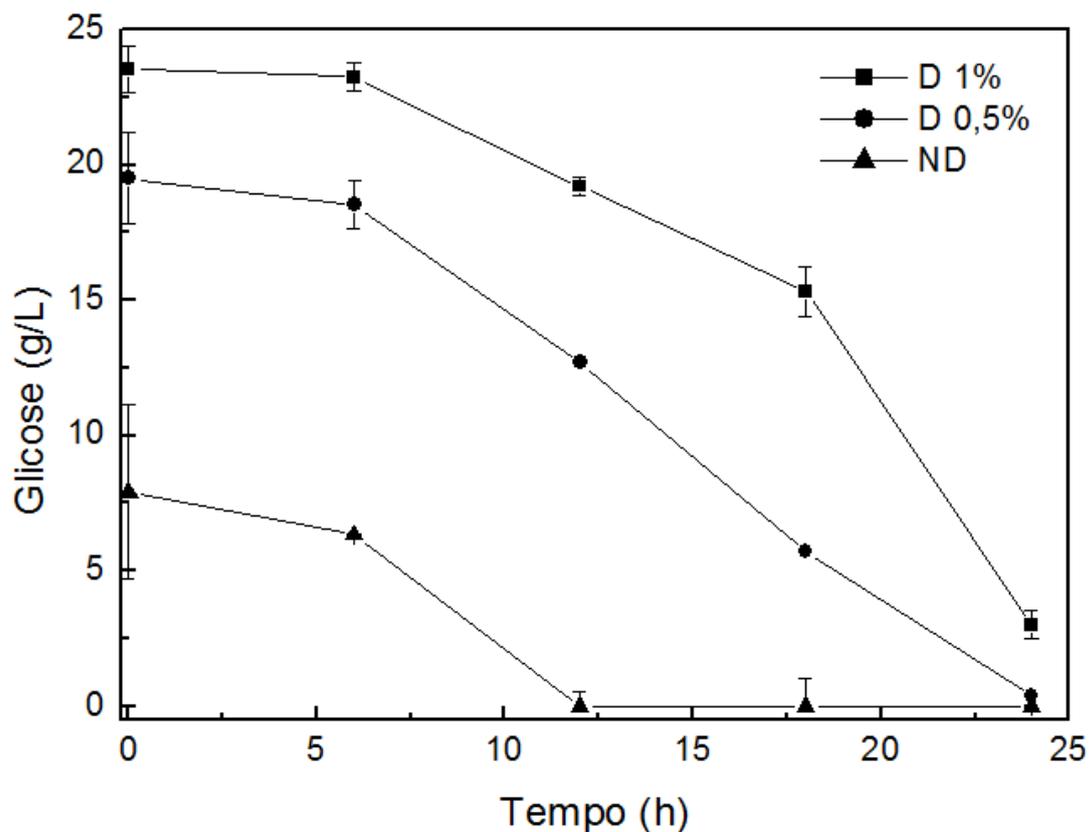


Figura 5.2: Concentração de glicose durante as sacarificações e fermentações simultâneas utilizando os materiais ND, D 0,5 % e D 1 %.

A concentração inicial de glicose para o bagaço D 0,5 % e D 1 % foi de 19,5 e 23,5 g/L, respectivamente. Para o ND, cerca de 8 g/L foram liberados. A análise de variância mostrou que não houve diferença significativa nas concentrações iniciais dos materiais deslignificados ($F = 0,06$; $\alpha = 0,05$).

Na produção de etanol, os bagaços deslignificados apresentaram perfis semelhantes nas SSF (Figura 5.3). A produção de etanol foi 15 % maior na SSF do bagaço D 1 % em relação à produção na SSF do bagaço D 0,5 %, novamente por este material conter maior teor de celulose. As concentrações finais de etanol foram 8,7 e 10,3 g/L, na SSF dos materiais D 0,5 % e D 1 %, respectivamente. Entretanto, a análise de variância mostrou que a produção de etanol com 24 horas, não foi significativamente diferente ($F = 6,43$; $\alpha = 0,05$).

para os materiais deslignificados. A SSF do material ND alcançou a concentração máxima de 2,7 g/L de etanol em 12 horas de fermentação.

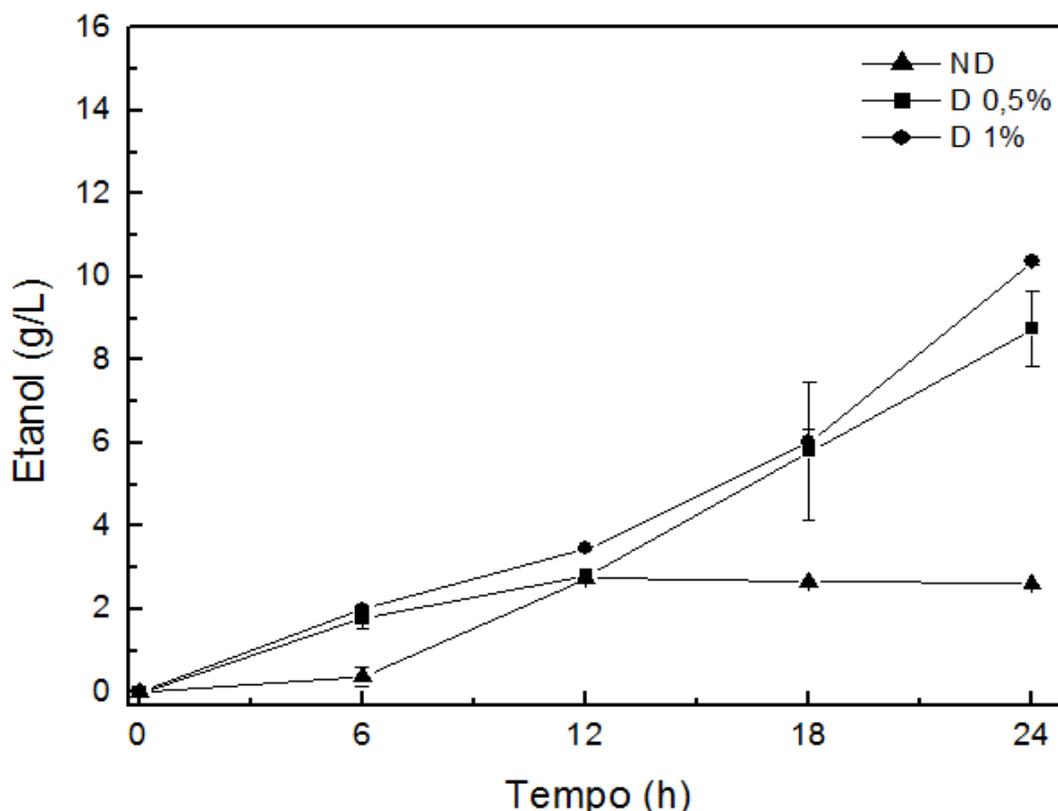


Figura 5.3: Concentração de etanol durante as sacarificações e fermentações simultâneas dos materiais ND, D 0,5% e D1%.

Santos *et al.*, (2010b), realizando sacarificação e fermentação simultânea nas mesmas condições da SSF D 1 %, mas com 25 FPU/g de celulose e 16 horas de pré-sacarificação, encontraram em 24 horas, semelhante produção de etanol (12 g/L). Cargas enzimáticas maiores que 15 FPU/g de celulose não permite um aumento da conversão, uma vez que o excesso de enzima adsorvido sobre o substrato limita a difusão da glicose através da estrutura lignocelulósica (Carrillo *et al.*, 2005).

Quanto às conversões de celulose em etanol (ECC), estas acompanharam o mesmo perfil de etanol, isto é, a conversão máxima com o material ND foi alcançada com 12 horas e com os materiais deslignificados, ainda estava em ascensão com 24 horas (Figura 5.4). As conversões de

celulose em etanol nas SSF dos materiais deslignificados, com 24 horas, também não foram significativamente diferentes ($F = 1,62$; $\alpha = 0,05$).

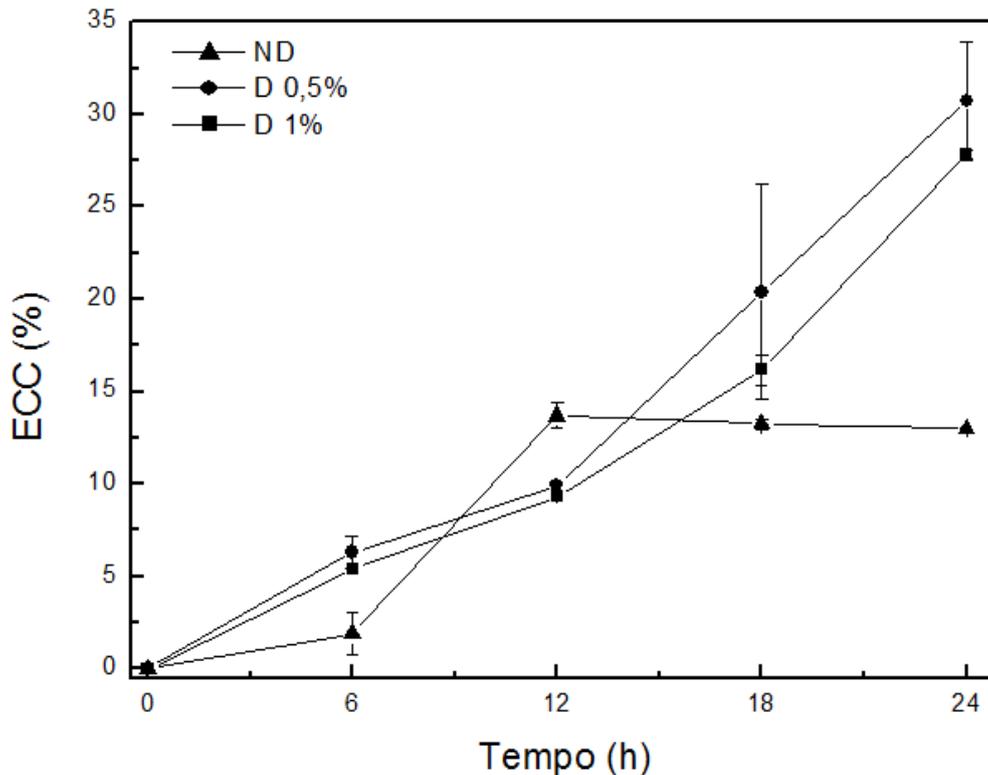


Figura 5.4: Conversão de celulose em etanol nas sacarificações e fermentações simultâneas dos materiais ND, D 0,5% e D 1%.

Os rendimentos em etanol ($Y_{P/S}$) e as eficiências das fermentações (E_f) nas SSF foram calculados a partir das concentrações de glicose obtidas nas hidrólises enzimáticas (Figura 5.1), variando a temperatura e a agitação. A Tabela 5.2 apresenta a produtividade, o rendimento e a eficiência encontrada nas SSF dos bagaços deslignificados. Os valores de rendimentos e eficiências encontrados são característicos de fermentações de etanol sem ausência completa de oxigênio. Isso ocorreu devido à leve aeração promovida pela agitação de 80 rpm. Para o cálculo da produtividade volumétrica, foi considerado o tempo de fermentação da SSF, sem levar em conta o tempo da pré-sacarificação. Dessa forma, o tempo da produtividade volumétrica máxima foi de 24 horas.

Tabela 5.2: Produtividades (Q_P), rendimentos ($Y_{P/S}$) e eficiências (E_f) nas SSF dos materiais deslignificados.

| SSF | Q_P (g/L.h) | $Y_{P/S}$ (g etanol/g glicose) | E_f (%) |
|--------|---------------|-----------------------------------|-----------|
| D 0,5% | 0,36 | 0,35 | 68,98 |
| D 1% | 0,43 | 0,33 | 65,06 |

Visando aumentar a produção de etanol, foi realizada SSF em batelada alimentada adicionando-se 1 g de bagaço de cana-de-açúcar com intervalo de 24 horas, até 120 horas. Foi utilizado apenas o material D 0,5 %, uma vez que as conversões de celulose em etanol não foram significativamente diferentes entre os materiais deslignificados. Como todas as SSF até então realizadas tinham sido até 24 horas, além da batelada alimentada, também foi realizada SSF em batelada e até 120 horas (Figuras 5.5 e 5.6).

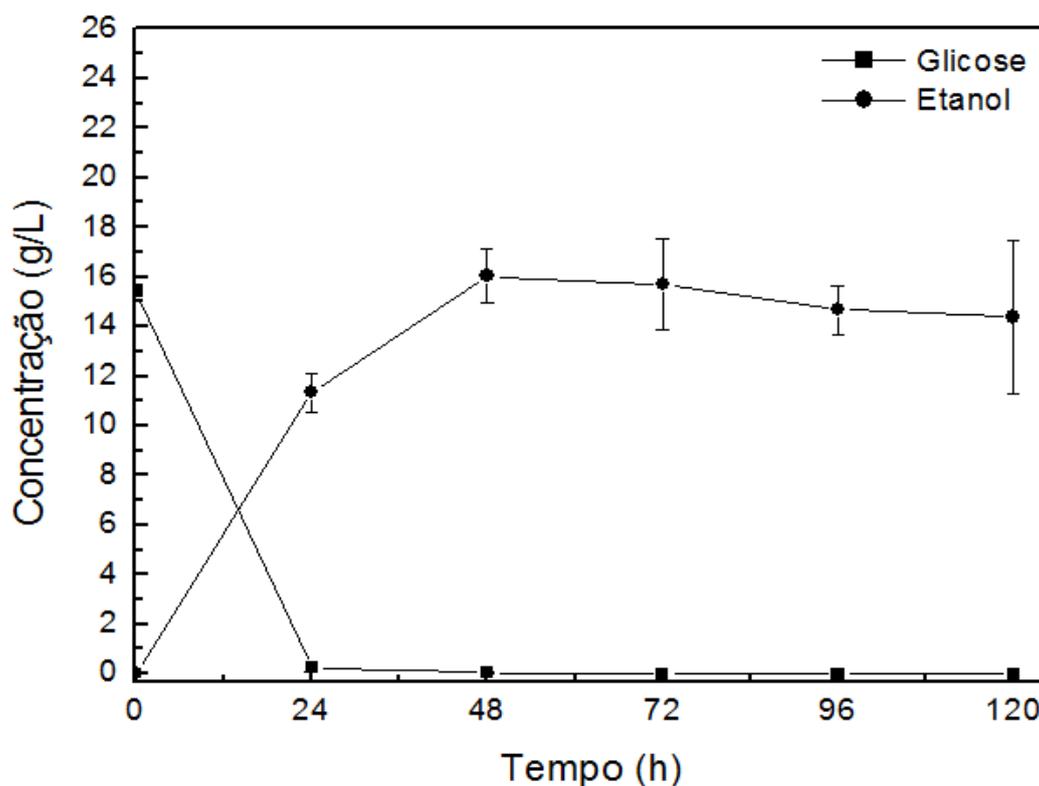


Figura 5.5: Concentração de glicose e de etanol em SSF do bagaço D 0,5 % e em batelada.

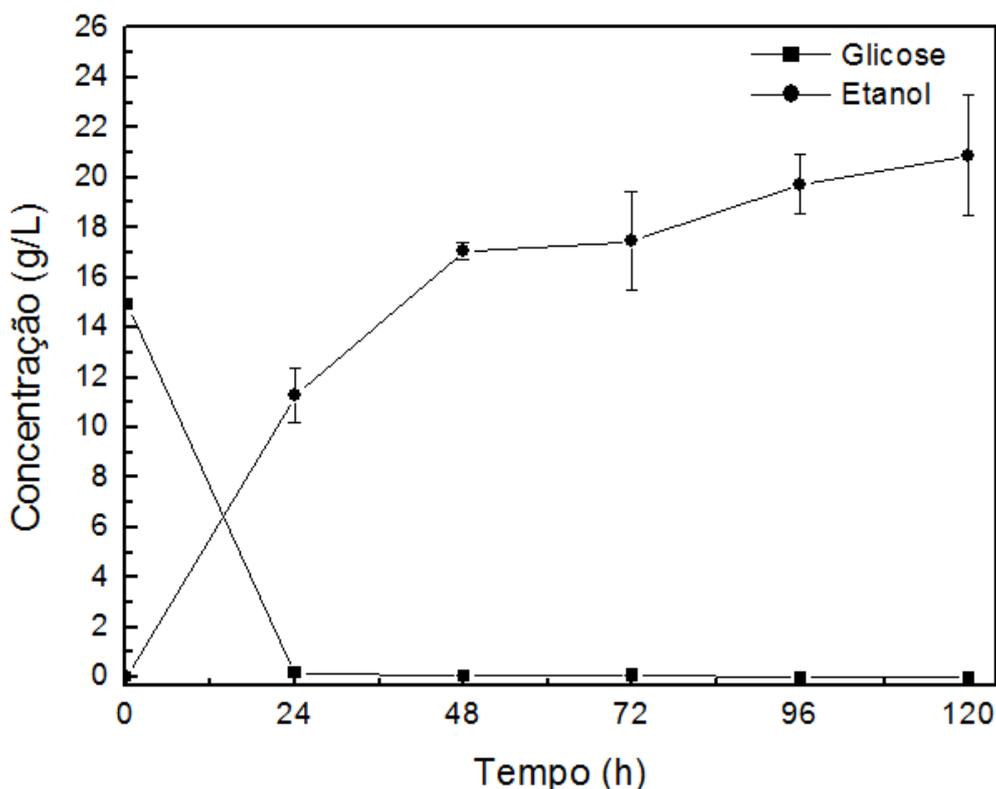


Figura 5.6: Concentração de glicose e de etanol em SSF do material D 0,5 % e em batelada alimentada.

Como pode ser observado nos gráficos das bateladas, a glicose foi totalmente consumida em 24 horas de fermentação. Não havendo acúmulo durante a batelada alimentada. O fato é que, a taxa de absorção da glicose pelas leveduras excedeu a taxa de hidrólise pelas enzimas. Assim foi verificado por Rudolf *et al.*, (2005), que realizou SSF em batelada alimentada com coníferas. Os autores partiram de uma carga de 6 % de substrato até 10 %, similar as concentrações deste trabalho.

Uma grande quantidade de substrato inicial pode causar problemas de mistura e transferência de calor devido às propriedades reológicas de uma suspensão muito densa e fibrosa (Rudolf *et al.*, 2005). No processo em batelada alimentada, esses problemas podem ser evitados, uma vez que o substrato adicionado é hidrolisado gradualmente e a viscosidade da mistura diminui (Chen *et al.*, 2007).

A concentração de etanol com 24 horas, foi cerca de 11 g/L para as bateladas simples e alimentada, uma vez que a primeira alimentação só iniciou

após retirar a amostra com 24 horas. Na batelada simples, não foi observado aumento na produção de etanol após 48 horas. A concentração máxima de etanol neste caso 16 g/L. Por outro lado, a concentração máxima de etanol na SSF em batelada alimentada foi 20,8 g/L com 120 horas, o que equivale a um aumento de 24 %.

A análise de variância mostrou ao nível de 95% de probabilidade ($p > 0,05$) que não houve diferença significativa na produção de etanol, quando comparados os intervalos de 24 até 120 horas para a batelada simples. Os testes F para cada intervalo de tempo foram: $F = 8,94$ (24 – 48 h), $F = 0,05$ (48 – 72 h), $F = 0,47$ (72 – 96 h) e $F = 0,02$ (96 – 120 h). No entanto, para a batelada alimentada, houve diferença significativa apenas para os resultados com 24 e 48 horas ($F = 51,82$), quando foi feita a primeira alimentação com 1 g de bagaço. Nos três últimos intervalos não houve diferença significativa.

A partir dos valores de etanol, foram calculadas as conversões de celulose em etanol (Figura 5.7), que foram levemente maiores na SSF em batelada do que em batelada alimentada, alcançando o valor máximo de 60 % com 48 horas. Comparando-se este valor com aquele obtido com 24 horas (40 %), observa-se que a ECC em batelada alimentada foi 50 % maior com 48 horas do valor encontrado com 24 horas.

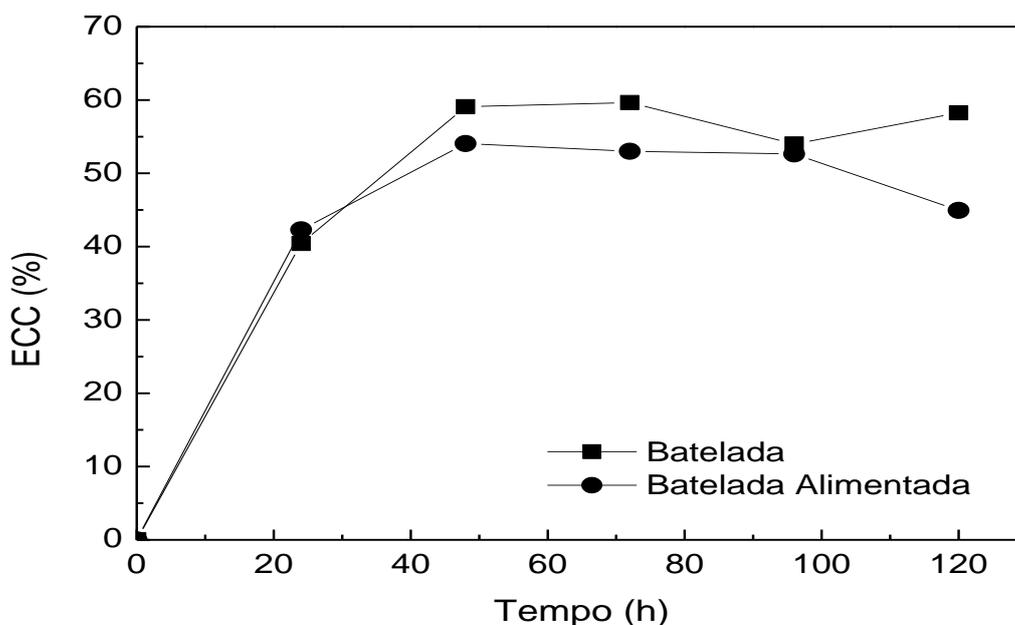


Figura 5.7: Conversão de celulose em etanol nas SSF do material D 0,5 % em batelada e em batelada alimentada.

5.3 Comparação entre as Sacarificações e Fermentações Simultâneas

A Figura 5.8 apresenta as concentrações máximas de etanol e suas respectivas produtividades em todas as sacarificações e fermentações simultâneas realizadas neste trabalho. A maior produção de etanol ocorreu quando foi utilizado o material deslignificado com 0,5 % de NaOH (D 0,5 %) e a SSF foi em batelada alimentada, onde no gráfico é representado pela letra (E). Apesar da produtividade volumétrica em etanol neste caso ter sido menor que aquela observada na SSF com o material não deslignificado. Por outro lado, a maior produtividade foi observada na SSF com o material D 1 % (C). Entretanto, comparando-se os valores máximos de etanol encontrados na SSF (E) (20,9 g/L) e na SSF C (10,4 g/L), verifica-se que a produção de etanol foi duas vezes maior na SSF (E).

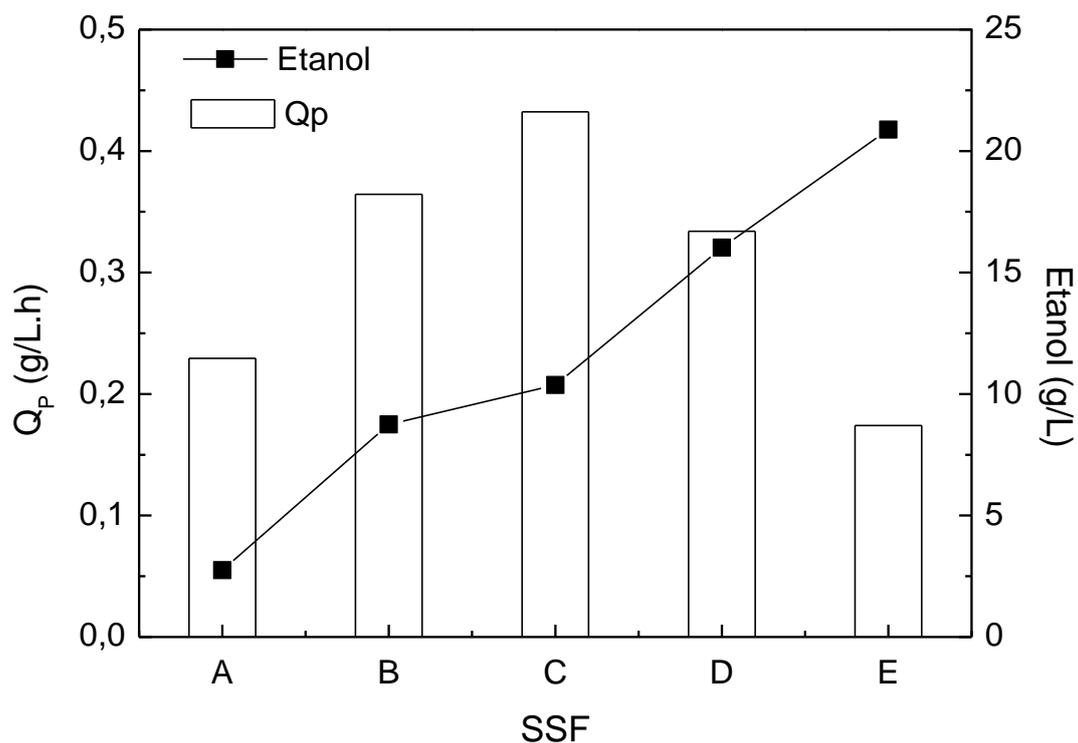


Figura 5.8: Concentração máxima de etanol e respectivas produtividades volumétricas encontradas nas sacarificações e fermentações simultâneas, onde: A (ND), B (D 0,5 %), C (D 1 %), D (D 0,5 % - batelada) e E (D 0,5 % - batelada alimentada).

A Figura 5.9 apresenta o aumento na produção de etanol na SSF (E) em relação às demais sacarificações e fermentações simultâneas, isto é, 30 % em relação à SSF D, 102 % em relação à SSF C, 139 % em relação à SSF B e 700% em relação à SSF A. Observando a Figura 5.9, verifica-se que a SSF do material D 0,5 % em batelada alimentada proporcionou maior produção de etanol que todas as demais estratégias utilizadas neste trabalho.

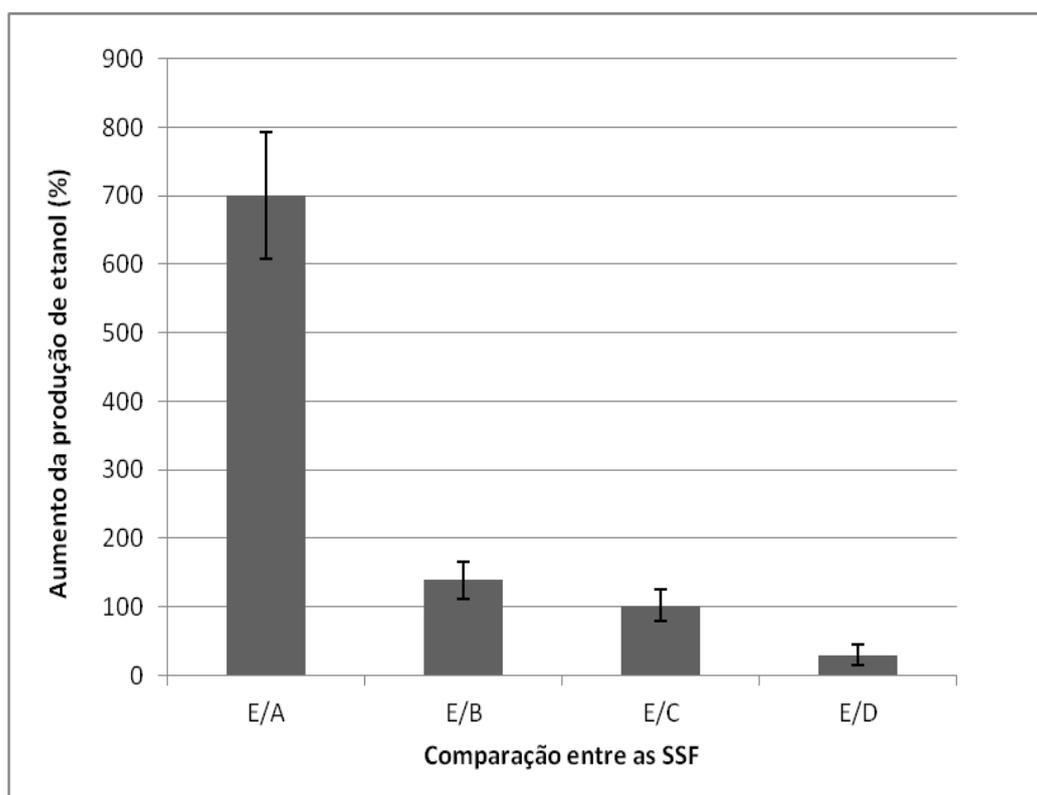


Figura 5.9: Aumento da produção de etanol em batelada alimentada (E) em relação às demais Sacarificações e fermentações simultâneas: A (ND), B (D 0,5%), C (D 1 %), D (D 0,5% - batelada).

Para que o etanol celulósico seja uma alternativa economicamente competitiva aos combustíveis fósseis é necessário reduzir os custos de produção, uma vez que a recuperação de etanol por destilação é uma das etapas de maior gasto de energia. Assim, os custos da destilação diminuem quando a concentração de etanol aumenta e, isto ocorre na produção a partir de material lignocelulósico, quando se aumenta o substrato (Wingren *et al.*, 2003). Daí a importância dos resultados obtidos na batelada alimentada, em

que a produção de etanol aumentou (Figura 5.9) e a alta viscosidade de uma SSF em batelada, com 12 % de sólidos, foi evitada. Além disso, tentativas de se realizar SSF em batelada e com concentrações de substrato maiores que 8 % foram realizadas, mas sem sucesso.

6. CONCLUSÕES

- O pré-tratamento por explosão a vapor, antes da deslignificação, permite que o menor uso de soda na deslignificação promova semelhante conversão de celulose em glicose ou em etanol, daquela encontrada com o material deslignificado com o dobro de soda;
- As conversões de celulose em glicose ou etanol, nas hidrólises dos materiais deslignificados (D 0,5 % e D 1 %) foram semelhantes devido à redistribuição da lignina no material que ocorre com o pré-tratamento por explosão a vapor, e não apenas ao teor de lignina;
- A conversão de celulose em glicose ou etanol na hidrólise do material não deslignificado (ND) foi menor que as conversões dos materiais deslignificados, devido à presença de lignina que limitou o acesso das enzimas;
- Uma eficiente conversão de celulose em glicose depende do teor de lignina, bem como da sua distribuição no material;
- A redução do teor de lignina alcançado na deslignificação com 0,5 % de NaOH, associada à SSF em batelada alimentada permitiu o aumento da produção de etanol em 700 % em relação ao material não deslignificado e em 102 % em relação ao material deslignificado com o dobro de NaOH.

7. REFERÊNCIAS

ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SHAIKH, H.; SINGH, R.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n. 1, p. 6-10, 2005.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

AMORIM, H. V. **Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia**. 1° ed., Piracicaba: Fermentec, p. 448, 2005.

BANERJEE, R.; PANDEY, A. Bio-industrial applications of sugarcane bagasse: a technological perspective. **Internacional Sugar Journal**, v. 104, n. 1238, p. 66-67, 2002

BARCELOS, C.A.; MAEDA, R.N.; BETANCUR, G.J.V.; PEREIRA, N. The Essentialness of Delignification on Enzymatic Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse Cellulignin for Second Generation Ethanol Production. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-6. *Accept for publication*, 2012.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4862-4874, 2010.

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n. 44, p. 48-54, 2010.

CANILHA, L.; SANTOS, V. T. O.; ROCHA, G. J. M.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; GIULIETTI, M.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1467-1475, 2011.

CARRILLO, F.; LIS, M. J.; COLOM, X.; LÓPEZ-MESAS, M.; VALLDEPERAS, J. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic study. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3360-3364, 2005.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CGEE - **Química verde no Brasil: 2010-2030** - Ed. revista e atualizada. - Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, cap. 8, p 350, 2010.

CHRISTOFOLETTI, G. B. Estudo dos efeitos de etapas de pré-tratamento na hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar. **Dissertação de Mestrado**. Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 2010.

CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, n. 2, p. 85-89, 2007.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento -. Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar. Safra 2011/2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=>. Acessado em: 03/05/2012

FAN, L.; GHARPURAY, M.; LEE, Y. Cellulose hydrolysis. **Biotechnology monographs**. Volume 3. 1987.

FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C.; BOM, E. P. S. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, n. 1, p. 65-76, 2010.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, n. 6, p. 618-628, 2002.

GHOSE, T. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOUVEIA, E. R., NASCIMENTO, R. T., SOUTO-MAIOR, A. M., MORAES ROCHA, G. J. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 1, n. 4, p. 27-33, 2009.

HENDRIKS, A.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

HSU, T. A. Pretreatment of biomass. In Handbook on **Bioethanol: Production and Utilization**. Edited por: Wyman C.E. Washington, DC, USA: Taylor & Francis. p. 179-212, 1996.

JIMENEZ-FLORES, R.; FAKE, G.; CARROL, J.; HOOD, E.; HOWARD, J. A novel method for evaluating the release of fermentable sugars from cellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, n. 5, p. 206-211, 2010.

KONDO, T. The relationship between intramolecular hydrogen bonds and certain physical properties of regioselectively substituted cellulose derivatives. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 35, n. 4, p. 717-723, 1997.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. **Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, Vol. 3, cap. 1, p.1-43, 2001.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 426-432, 2007.

MARTÍN, C.; THOMSEN, M.H.; HAUGGAARD-NIELSEN, H.; BELINDATHOMSEN, A. Wet oxidation pretreatment, enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of clover-ryegrass mixtures. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8777-8782, 2008.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R. LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OHGREN, K.; BURA, R.; LESNICKI, G.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and

separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 834-839, 2007.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF-an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 7, p. 1-14, 2008.

OLIVEIRA, F. M. V. Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação e fermentação simultânea da celulose de palha de cana. **Dissertação de Mestrado**, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, SP, Brasil, 2010.

OLIVEIRA, V. S., MACHADO NETO, A. A., WANDERLEY, M. C. A., ROCHA, G. J. M., GOUVEIA, E. R. Effect of Time and Temperature in the Alkaline Delignification on the Cellulose Hydrolysis. In: **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Anais Sinaferm, Caxias do Sul, UCS, (CD ROM), 2011.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 1069-1079, 2005.

PILÓ-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E.A.; MORAIS, S.A.L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, v.16, p.435-448, 1993.

PINTO, F. H. P. B. Etanol celulósico: Um estudo de viabilidade econômico-finaceira. **Dissertação de Mestrado**, Escola de Economia de São Paulo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz- Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2010.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T.; CURVELO, A. A. S.; ARAÚJO, G. T. A fast and Accurate Method for Determination of Cellulose and Polyoses by HPLC. In: Resumos do **Fifth Brazilian Symposium on Chemistry of Lignins and Other Wood Components**, Curitiba - PR, Brasil, 1997.

ROCHA, G. L. M.; GONÇALVES, A. R.; OLIVEIRA, B. R.; OLIVARES, E. G.; ROSSELL, C. E. V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n.1, p. 274-279, 2012.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**, 1. Ed. São Paulo: Casa de Pão, 2005.

RUDOLF, A.; ALKASRAWI, M.; ZACCHI, G.; LIDÉN, G. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 195-204, 2005.

SALIBA, E.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A. L.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 917-928, 2001.

[SANTOS, J. R. A.](#); GUSMÃO, N. B.; GOUVEIA, E. R. Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial desempenho para a produção de etanol em condições adversas de temperatura e de agitação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 75-80, 2010a.

SANTOS, J. R. A., SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R.; MARTÍN, C. Comparação entre processos de SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar

para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010b.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012a.

SANTOS, J. R. A.; LUCENA, M. GUSMÃO, N.; GOUVEIA, E. R. Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 in simultaneous saccharification and fermentation of delignified sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012b.

SOCCOL, C.; VANDENBERGHE, L.; MEDEIROS, A.; KARP, S.; BUCKERIDGE, M.; PEREIRA RAMOS, P.; PITARELO, A.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.; FERRARA, M.; BON, E.; MORAES, L.; ARAÚJO, J.; TORRES, F. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**. v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

TAKAGI, M.; ABE, S.; SUZUKI, S.; EMERT, G.H. AND YATA, N. A method for production of alcohol directly from cellulose using cellulase and yeast. In: Ghose, T.K. ed. **Proceedings of Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy, Chemicals and Microbial Protein: Symposium Proceedings**, New Delhi, India, p. 551-571, 1977.

UNICA - União da indústria da cana-de-açúcar- Boletim de notícias. Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticias>. Acessado em: 03/05/2012.

VASCONCELOS, P. H. C. Uma História feita de Açúcar e Álcool: apontamentos para uma discussão. **Revista Crase**, v. 1, n. 1, p. 61-68, 2010.

WANDERLEY, M. C. A. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar em batelada alimentada para produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 em processo de SHF. **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, 2012.

WINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottleneck. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 4, p. 1109-1117, 2003.