

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Luciana Moreira Inácio

**Software para simulação do processo de sacarificação e fermentação simultâneas de
biomassas lignocelulósicas para produção de etanol de segunda geração**

Uberaba

2014

Luciana Moreira Inácio

Software para simulação do processo de sacarificação e fermentação simultâneas de biomassas lignocelulósicas para produção de etanol de segunda geração

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Inovação Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bacci da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Marlei Barboza Pasotto

Uberaba

2014

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

I32s Inácio, Luciana Moreira
Software para simulação do processo de sacarificação e fermentação
simultâneas de biomassas lignocelulósicas para produção de etanol de segun-
da geração / Luciana Moreira Inácio. -- 2014.
63 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica) -- Uni-
versidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2014.
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bacci da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Marlei Barboza Pasotto

1. Biomassa. 2. Álcool como combustível - Indústria. 3. Biocombustíveis.
4. Software – Desenvolvimento. I. Silva, Marcelo Bacci da. II. Universidade
Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 620.91

LUCIANA MOREIRA INÁCIO

SOFTWARE PARA SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO E
FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS
PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Trabalho de conclusão apresentado ao
Programa de Mestrado Profissional em
Inovação Tecnológica da Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, como requisito
para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 24 de março de 2014

Banca Examinadora:

Marcelo Bacci da Silva

Prof. Dr. Marcelo Bacci da Silva
Orientador – PMPIT - UFTM

Eloizio

Prof. Dr. Eloizio Julio Ribeiro
Membro titular – UFU

Mônica Hitomi Okura

Prof^{ta}. Dr^a. Mônica Hitomi Okura
Membro Titular – UFTM

Dedico ao meu marido Ronan, às minhas filhas, Maria
Eduarda e Rafaela e aos meus pais José Inácio e Regina

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido Ronan, pelo apoio incondicional.

Às minhas filhas, pela compreensão e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Bacci da Silva, pelos ensinamentos desde a graduação, assim como por sua dedicação, auxílio e disponibilidade, do meu sonho de entrar no programa até o trabalho finalizado.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marlei Barboza Pasotto, pelas contribuições que possibilitaram a conclusão deste.

Aos professores do programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica pelos conhecimentos compartilhados.

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

A preocupação com os impactos ambientais relacionados ao consumo de combustíveis fósseis e a necessidade de se gerar energia através de recursos renováveis, mostra ser necessário estudar o aproveitamento de materiais alternativos, visando a produção de energia limpa e a redução de poluentes na atmosfera como a utilização de biomassa lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração (2G). Este trabalho consiste em simular a produção de etanol 2G, a partir de um modelo matemático para a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) de biomassa lignocelulósica existente na literatura, otimizar o processo em reator batelada e comparar reatores batelada e contínuo nas mesmas condições. A simulação do processo SSF para produção de etanol 2G foi realizada elaborando-se um software no programa Matlab, com a otimização do processo em batelada através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e os resultados foram empregados na simulação para reator contínuo (CSTR). As condições do processo estudado foram 36°C, pH 4,8 e agitação de 300 rpm, sendo utilizados celulose microcristalina (Avicel PH 101) como substrato, complexo celulase Enzima Novozymes NS50052, com atividade de 97 FPU/g (inicialmente utilizada 4 g/l da mesma com carga de enzima de 9,7 FPU/g substrato) e como inóculo *Saccharomyces cerevisiae* da coleção do ATCC, com concentração inicial de 0,3 g/l. Estudando-se os efeitos das variáveis do processo, observou-se que as maiores interferências são das concentrações de celulose, seguida pelas de enzimas e células. Melhores concentrações de produto no processo batelada são obtidos com as concentrações máximas de celulose (60 g/l), de células (0,468 g/l) e de enzima (5,58 g/l). Em reator contínuo, utilizando as mesmas concentrações de enzimas e células, taxa de diluição de 0,01 h⁻¹ e maiores concentrações iniciais de celulose na cultura e na alimentação, aumenta-se a produção de etanol. Constatou-se que, simulando o processo SSF em reatores batelada e contínuo no software, sob mesmas condições de concentrações iniciais de cellulose, enzimas e células para 48h de processo, o reator contínuo apresenta maior concentração de etanol no produto que o reator batelada.

Palavras-chave: Biomassa lignocelulósica. SSF. Etanol 2G.

ABSTRACT

Concern about the environmental impacts associated to the consumption of fossil fuels and the need to generate power through renewable resources, is shown to be necessary to study the use of alternative materials aiming the production of clean energy and the reduction of pollutants in the atmosphere such as the use of lignocellulosic biomass to produce second generation ethanol (2G). This work consists in simulating the 2G ethanol production, from a mathematical model for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulosic biomass existing in the literature, optimizing the process in batch reactor and comparing batch and continuous reactors under the same conditions. The simulation of the SSF process of 2G ethanol production was performed using a developing software in Matlab program, with optimization of batch process through a rotational central composite design (RCCD) and the results were used in simulation for continuous reactor (CSTR). The conditions of the process studied were 36°C, pH 4.8 and agitation of 300 rpm, microcrystalline cellulose (Avicel PH 101) were used as substrate, cellulase complex enzyme Novozymes NS50052, with activity of 97 FPU/g (initially used 4 g/l with the same enzyme loading of 9.7 FPU/g substrate) and as inoculum *Saccharomyces cerevisiae* ATCC's collection, with initial concentration of 0.3 g/l. Studying the effects of the process variables, it was found that the higher interferences are cellulose concentration, followed by enzymes and cells concentrations. Greater concentrations of the product in batch process are obtained with the maximum cellulose concentrations (60 g/l), cells (0.468 g/l) and enzyme (5.58 g/l). In continuous reactor, using such concentrations, the dilution rate of 0.01 h⁻¹ and higher initial culture cellulose concentration, the ethanol production increases. It was found, by simulating the SSF process in batch and continuous reactors in software, under the same conditions of cellulose, enzymes and cells concentrations for 48h process, the continuous reactor has a higher ethanol concentration in product than batch reactor.

Keywords: lignocellulosic biomass, SSF, 2G ethanol

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diagrama do processo integrado de produção de etanol de primeira e segunda geração a partir da cana-de-açúcar	5
Figura 2 – Estrutura da biomassa lignocelulósica	6
Figura 3 – Acessibilidade de enzimas degradantes em material lignocelulósico	8
Figura 4 – Etapas para obtenção de etanol a partir de diferentes matérias-primas	12
Figura 5 – Representação esquemática da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica	13
Figura 6 – Esquema de um DCCR com 8 pontos fatoriais + ponto central + 6 pontos axiais	25
Figura 7 – Gráfico da simulação do processo SSF em reator batelada de material lignocelulósico com concentrações iniciais (g/l) $C_0 = 40$, $X_0 = 0,3$, $e_0 = 4$ e tempo $t = 80h$	29
Figura 8 – Superfície de resposta concentração inicial de celulose (C_0) x concentração inicial de enzima (e_0) x concentração de etanol em g/l	33
Figura 9 – Superfície de contorno representando a produção de etanol (legenda em g/l), a partir das concentrações iniciais de enzima (e_0) e de celulose (C_0) em g/l	33
Figura 10 – Superfície de resposta concentração inicial de celulose (C_0) x concentração inicial de enzima (e_0) x concentração de etanol em g/l	34
Figura 11 – Superfície de contorno representando a produção de etanol (legenda em g/l) a partir das concentrações iniciais de células (X_0) e de celulose (C_0) em g/l	35
Figura 12 – Superfície de resposta concentração inicial de enzimas (e_0) x concentração inicial de células (X_0) x concentração de etanol em g/l	36
Figura 13 – Superfície de contorno representando a produção de etanol (legenda em g/l) a partir das concentrações iniciais de enzima (e_0) e células (X_0) em g/l	36
Figura 14 – Gráfico do processo SSF em reator contínuo nas condições iniciais de celulose na cultura, celulose no fluxo de alimentação, de enzima, células iguais a 20 g/l, 20 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l, taxa de diluição de $0,01 h^{-1}$ e tempo de 48h	38
Figura 15 – Gráfico do processo SSF em reator batelada nas condições iniciais de celulose, de enzima, células iguais a 20 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l e tempo de 48h	38
Figura 16 – Gráfico do processo SSF em reator contínuo nas condições iniciais de celulose na cultura, celulose no fluxo de alimentação, de enzima, células iguais a 6,4 g/l,	

6,4g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l, taxa de diluição de 0,01 h ⁻¹ e tempo de 48h	39
Figura 17 – Gráfico do processo SSF em reator batelada nas condições iniciais de celulose, de enzima, células iguais a 6,4 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l e tempo de 48h	40
Figura 18 – Gráfico do processo SSF em reator contínuo nas condições iniciais de celulose na cultura, celulose no fluxo de alimentação, de enzima, células iguais a 40,0 g/l, 40,0 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l, taxa de diluição de 0,01 h ⁻¹ e tempo de 48h	41
Figura 19 – Gráfico do processo SSF em reator batelada nas condições iniciais de celulose, de enzima, células iguais a 40 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l e tempo de 48h	42
Figura 20 – Gráfico do processo SSF em reator contínuo nas condições iniciais de celulose na cultura, celulose no fluxo de alimentação, de enzima, células iguais a 60,0 g/l, 20,0 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l, taxa de diluição de 0,01 h ⁻¹ e tempo de 48h	43
Figura 21 – Gráfico do processo SSF em reator contínuo nas condições iniciais de celulose na cultura, celulose no fluxo de alimentação, de enzima, células iguais a 60,0 g/l, 40,0 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l, taxa de diluição de 0,01 h ⁻¹ e tempo de 48h	43
Figura 22 – Gráfico do processo SSF em reator contínuo nas condições iniciais de celulose na cultura, celulose no fluxo de alimentação, de enzima, células iguais a 60,0 g/l, 60,0 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l, taxa de diluição de 0,01 h ⁻¹ e tempo de 48h	44
Figura 23 – Gráfico do processo SSF em reator batelada nas condições iniciais de celulose, de enzima, células iguais a 60 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l e tempo de 48h	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química de biomassas lignocelulósicas	7
Tabela 2 – Pré-tratamentos de biomassas lignocelulósica	9
Tabela 3 – Parâmetros do modelo SSF para produção de etanol de segunda geração	23
Tabela 4 – Simulação do Delineamento do Composto Central Rotacional para produção de Etanol de segunda geração a partir do processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas da biomassa lignocelulósica com 3 fatores (concentrações de celulose, enzima e células)	31
Tabela 5 – Estimação dos efeitos das variáveis concentrações iniciais de celulose (C_0) enzima (e_0) e células (X_0) para produção de etanol lignocelulósico.....	32
Tabela 6 – Variáveis de saída para simulação do processo SSF em reator batelada com concentrações iniciais de celulose na cultura, enzimas e células de 60 g/l, 5,58 g/l e 0.468 g/l, variando-se as concentrações iniciais de celulose no fluxo de alimentação	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AFEX – Ammonia Fiber Explosion

ARP – filtração de amônia reciclada

Ca(OH)₂ – hidróxido de cálcio

(C₆H₁₀O₅)_n – celulose

CMD – conversão microbiana direta

CO₂ – dióxido de carbono

CSTR – reator tanque agitado contínuo

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional

FPU – Filter paper unit (unidade de papel de filtro)

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

HCl – ácido clorídrico

HNO₃ – ácido nítrico

LHW – Liquid Hot Water

NaOH – hidróxido de sódio

ONU – Organização das Nações Unidas

SHF – Hidrólise e Fermentação Separadas

SO₂ – dióxido de enxofre

SSCF – sacarificação simultânea e co-fermentação

SSF – Sacarificação e Fermentação Simultâneas

LISTA DE SIGLAS

B – concentração de celobiose (g/l)

B_1 – celobiose convertida em r_1 (g/l)

C – concentração de celulose (g/l)

C_0 – concentração inicial de celulose no reator batelada ou na cultura do reator contínuo (g/l)

C_1 – concentração inicial de celulose no fluxo de alimentação (g/l)

D – taxa de diluição (h^{-1})

e – concentração de enzima (g/l)

e_0 – concentração inicial de enzima (g/l)

e_e – concentração de endogluconase e exocelubiohidrolase (g/l)

E – concentração de etanol (g/l)

$e_e C_{in}^*$ – complexo ineficiente formado pelas enzimas e substrato (g/l)

F – taxa de alimentação no reator contínuo (l/h)

G – concentração de glicose (g/l)

In = intervalo entre V_0 e P_c

k – número de variáveis do DCCR

k_1 – constante da taxa específica da hidrólise de celulose para celobiose (l/(g.h))

k_1' – variável associada à desativação da enzima (h^{-1})

k_2 – constante da taxa específica da hidrólise de celobiose para glicose (h^{-1})

k_3 - coeficiente de formação do produto associado ao crescimento de células ($=k_3' \cdot Y_{G/E}$)
(adimensional)

$k_4 =$ constante ($=k_4' \cdot f$)

k_4' – constante da taxa específica de desativação de enzima (l/ (g.h))

K_{1B} – constante de inibição da glicose e celobiose para exo-glucanase (g/l)

K_{1G} – constante de inibição da glicose e celobiose para endo-glucanase (g/l)

K_{2G} – constante de inibição da glicose para glucosidase (g/l)

K_G – constante de saturação da glicose para o crescimento microbiano (g/l)

m – coeficiente de manutenção do metabolismo endógeno dos micro-organismos (h^{-1})

Pc = ponto central

r_1 – taxa da reação da celulose para celobiose (g/(l.h))

r_2 – taxa de reação da celobiose para glicose (g/(l.h))

r_E – taxa de reação de formação do etanol (g/(l.h))

r_G – taxa de reação do consumo de glicose (g/(l.h))

r_X – taxa de reação de formação de células (g/(l.h))

t – tempo do processo (h)

V – volume do reator (l)

V_c = valor codificado da variável

V_o = valor original da variável

X – concentração de células (g/l)

X_0 – concentração inicial de células (inóculo de leveduras) (g/l)

$Y_{E/G}$ – fator de conversão do etanol a partir da glicose (g/g)

$Y_{X/E}$ – coeficiente de conversão de células a partir do etanol (g/g)

$Y_{X/G}$ – coeficiente de rendimento de massa de células em glicose (g/g)

α – parâmetro para cálculo dos valores axiais do DCCR

f – constante de proporcionalidade

μ – constante da taxa específica de crescimento de células (h^{-1})

μ_m – constante da taxa específica máxima de crescimento de células (h^{-1})

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	5
3.2 PRÉ-TRATAMENTOS	8
3.3 PROCESSOS PARA OBTENÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO	12
4 JUSTIFICATIVA	17
5 METODOLOGIA	18
5.1 ESTUDO DO PROCESSO SSF EM REATOR BATELADA	18
5.2 SIMULAÇÃO DO PROCESSO SSF	23
5.3 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL	25
5.4 SIMULAÇÃO DO PROCESSO SSF EM REATOR CONTÍNUO	26
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
6.1 SIMULAÇÃO DO PROCESSO SSF EM REATOR BATELADA	29
6.2 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL	30
6.3 SIMULAÇÃO DO PROCESSO SSF EM REATOR CONTÍNUO	37
7 CONCLUSÕES	46
8 REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda de energia mundial e os impactos ambientais gerados pela utilização de combustíveis fósseis, como o aumento de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera, vêm aumentando a necessidade de se utilizar fontes de energia renováveis como a hidráulica, a solar, a eólica e a biomassa.

Pode-se considerar biomassa, resíduos sólidos oriundos de animais ou vegetais e que podem apresentar alto potencial de energia como lascas de madeira, palha, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, entre outros. “Somente a biomassa, utilizada em processos modernos com elevada eficiência tecnológica, possui a flexibilidade de suprir a demanda tanto para a produção de energia elétrica quanto para mover o setor de transportes” (CORTEZ et al, 2008, p. 15).

Frente ao desejo de se aumentar a produção de biocombustíveis, no caso do Brasil o etanol, melhorias nos processos agrícolas e na produtividade a partir da matéria-prima se fazem necessárias. O etanol é um dos biocombustíveis mais vantajosos, pois pode ser produzido de forma direta a partir da sacarose da biomassa, denominado etanol de primeira geração, ou indireta, através da celulose de matérias-primas lignocelulósicas, o etanol de segunda geração.

A biomassa lignocelulósica empregada para a produção de etanol pode ser originária de resíduos de atividades agrícolas e de produtos florestais. Ljunggren, Wallberg e Zacchi (2011) destacam que a produção de etanol utilizando-se essa biomassa tem vantagens sobre aquelas à base de amido e sacarose, pois podem aumentar a produção sem a necessidade de se aumentar a área de plantio, já que utilizam os resíduos lignocelulósicos das indústrias. Entre eles pode-se destacar o bagaço e a palha de cana-de-açúcar.

A maior dificuldade de se obter etanol a partir dessa biomassa é a quantidade de lignina que a compõe. Esse composto dificulta a hidrólise do material, fazendo-se necessário um pré-tratamento. Os pré-tratamentos podem ser físicos, químicos, físico-químicos ou biológicos e são utilizados para diminuir a cristalinidade do material a ser hidrolisado. A conversão de celulose em etanol é obtida através da hidrólise da celulose, que se converte em açúcar, e da fermentação deste, obtém-se o etanol.

De acordo com Brethauer e Wyman (2010), são várias as combinações desses passos para produção de etanol de segunda geração. A hidrólise pode ser ácida, necessitando de altas temperaturas e com os inconvenientes como corrosão do equipamento e dificuldade em

separar resíduos do produto, ou enzimática. Na hidrólise enzimática utilizam-se enzimas, denominadas complexo celulasas a temperaturas mais baixas, com pouca formação de subprodutos, cujo custo já se equipara ao da hidrólise ácida. A fermentação, então, é obtida utilizando-se micro-organismos, entre eles *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo-se como produto principal, o etanol.

O processo denominado sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) combina essas duas operações em um único processo, sendo um dos mais promissores para produção de etanol lignocelulósico. Esse processo consiste na mistura da biomassa, enzimas e micro-organismos concomitantemente, dessa maneira, a celulose é hidrolisada em glicose, esta, assim que é produzida, é fermentada e o etanol é produzido. As vantagens desse processo em relação à hidrólise e fermentação separadas é a redução de custos, pois se minimiza a formação de subprodutos indesejáveis e neutraliza-se o efeito inibitório dos açúcares com relação à enzima.

O etanol de segunda geração, de acordo com Dias et al. (2011), ainda não ganhou escala industrial devido ao seu alto custo e ainda baixa eficiência do processo de produção, por isso, estudar melhorias na sua produção se fazem necessárias. O Brasil leva vantagens para a obtenção desse tipo de etanol, pois possui estrutura já instalada para a sua produção (indústria sucroalcooleira), além de enorme quantidade de biomassa a ser aproveitada a partir dos resíduos da própria cana-de-açúcar, como o bagaço e a palha.

A fim de se buscar melhorias na eficiência do processo SSF, neste trabalho foi realizado um estudo da cinética das reações e simulação do processo de sacarificação e fermentação simultâneas da biomassa lignocelulósica existente na literatura em software elaborado na linguagem Matlab. Em seguida, a partir de um delineamento composto central rotacional, estudou-se da otimização deste processo, verificando quais as variáveis que mais influenciam e as concentrações ótimas de celulose, enzima e células (inóculo de levedura), com o objetivo de se reduzirem custos e contribuindo para a propagação deste processo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Simular a produção de etanol de segunda geração, a partir de um modelo matemático para a sacarificação e fermentação simultâneas de biomassa lignocelulósica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Revisar as equações de um processo de sacarificação e fermentação simultâneas da celulose obtidas na literatura.
- b) Elaborar um algoritmo numérico (software) para simular a produção de etanol de segunda geração a partir das concentrações de celulose, enzima e células (inóculo de levedura), a fim de confirmar os resultados obtidos a partir das reações estudadas.
- c) Otimizar o processo SSF (sacarificação e fermentação simultâneas) a partir de um delineamento composto central rotacional.
- d) Comparar o rendimento do processo de SSF em reator batelada e reator contínuo, utilizando as mesmas condições iniciais ótimas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Desde a pré-história, o homem já utilizava a biomassa (lenha) para produção de energia (fogo). Atualmente, um dos objetivos de se utilizar a biomassa como fonte de energia é a preocupação com o aumento da emissão de gases do efeito estufa. Segundo Meneguello e Castro (2007), o encontro patrocinado pela ONU (Organização das Nações Unidas) em Kyoto, Japão, no ano de 1997, gerou a elaboração de um documento no qual os 20 países mais industrializados deveriam reduzir as taxas de emissão de gases como CO₂. Por outro lado, os países em desenvolvimento implementando técnicas de subtração de carbono na atmosfera, poderiam trocar seus créditos com os países desenvolvidos, no comércio denominado Mercado de Carbono. Assim, aplicariam mecanismos de desenvolvimento limpo a partir da utilização de fontes alternativas de energia e sua conservação (principalmente com o uso da biomassa), além do reflorestamento.

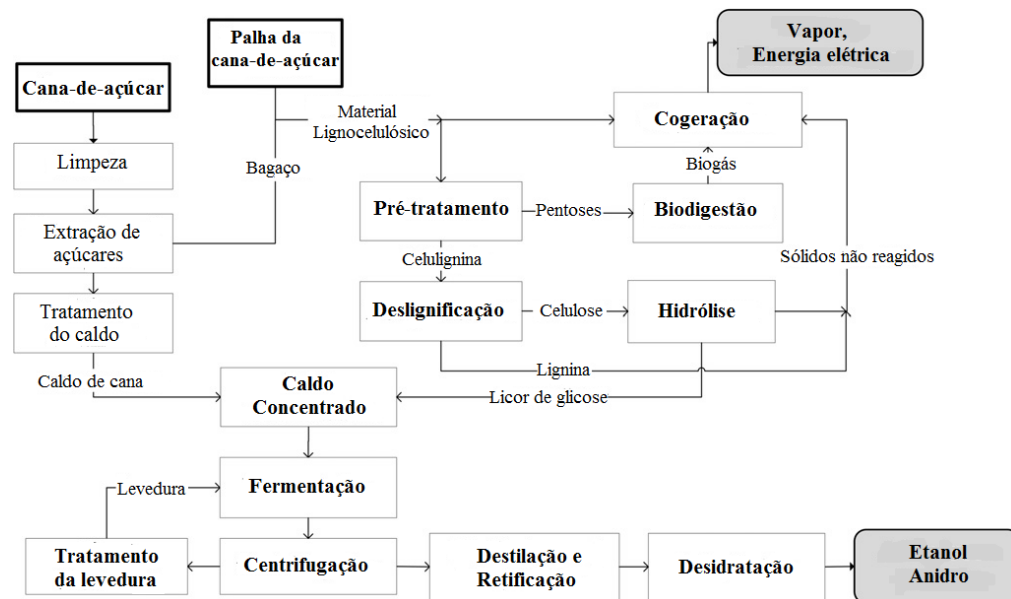
O Brasil tem sua importância em projetos de subtração de carbono da atmosfera, podendo destacar as usinas sucroalcooleiras, que utilizam a biomassa de cana-de-açúcar. Aproximadamente 10% da energia consumida no nosso país são oriundas da biomassa, em sua maioria produzida nas usinas de açúcar e álcool.

[...] no caso das usinas de geração de energia elétrica a biomassa de cana-de-açúcar, apesar de ser emitido carbono na fase da queima do combustível, ocorre o sequestro do carbono da fase do crescimento da cana, assim o balanço das emissões é nulo e os créditos de carbono são obtidos devido às emissões que são evitadas pela geração de energia elétrica nestas usinas em substituição às usinas térmicas a gás natural ou a óleo combustível, que possuem um balanço de emissões desfavorável. (MENENGUELLO; CASTRO, 2007, p. 35)

Segundo Brasil (2013), o Brasil é o maior produtor mundial de cana, assim como de seus produtos: açúcar e etanol. Seu plantio em nosso país não prejudica o de outros alimentos, por termos terras cultiváveis em abundância, assim como tecnologia de plantio. Na indústria canavieira, a conversão direta da biomassa em energia é a partir de sua combustão (geração de vapor) e a indireta, a queima de combustíveis líquidos ou gasosos produzidos a partir da biomassa (etanol, biogás), conforme representado na Figura 1.

Afirma-se que em pouco tempo as usinas não serão mais somente indústrias de açúcar e álcool, mas biorrefinarias. O bagaço de cana tem um grande potencial como fonte renovável de energia, podendo ser utilizado não somente em caldeiras para geração de calor e eletricidade no processo industrial de fabricação de álcool e açúcar, mas também, na geração de excedentes de energia elétrica que podem ser comercializados (GOÉS, 2008, p. 1).

Figura 1 – Diagrama do um processo integrado de produção de etanol de primeira e segunda geração a partir da cana-de-açúcar.



Fonte: DIAS et al., 2012, p. 250

Além de ser usado como combustível em caldeiras para a produção de vapor e da eletricidade, bagaço de cana pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de etanol. Uma vez que é composto por celulose, hemicelulose e lignina, ele pode ser convertido em açúcares fermentáveis através de pré-tratamento e os processos de hidrólise (DIAS et al, 2011, p.8966).

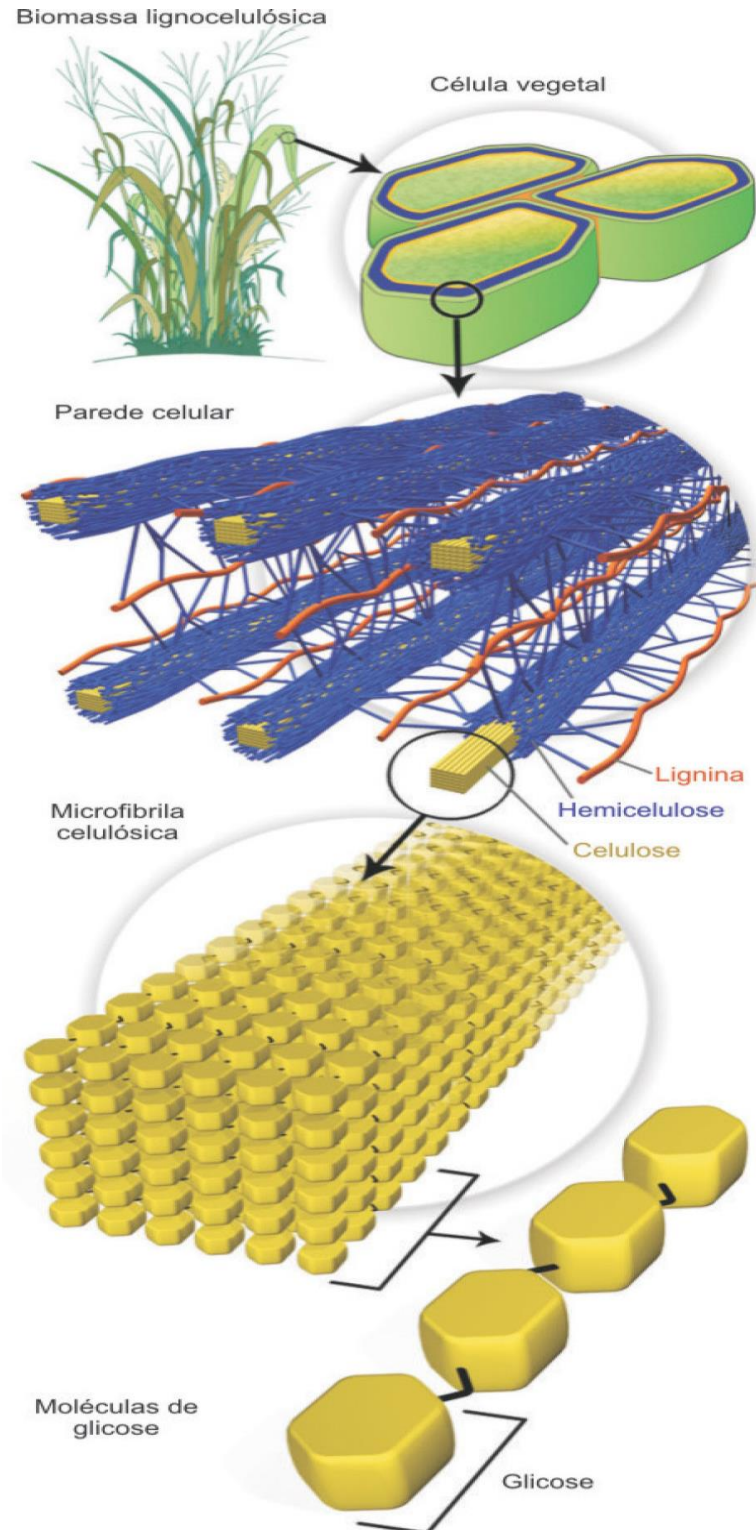
3.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

O recurso biológico renovável em maior abundância é a biomassa lignocelulósica.

Material celulósico ou lignocelulósico é um termo genérico para descrever os constituintes principais na maioria 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, da parte da planta escolhida, da idade de colheita, etc. (OGEDA; PETRI, 2010, p. 1550)

A composição do material lignocelulósico é de fibras de celulose, polímero formado por ligações glicosídicas, ou seja, formada por açúcares de seis carbonos, envoltas por hemicelulose (polímero composto por açúcares com cinco carbonos, denominados pentoses) e lignina, como está ilustrado na Figura 2. A lignina é um revestimento amorfo que concede à biomassa lignocelulósica rigidez e impermeabilidade, “... age como uma barreira natural ao ataque de micro-organismos e/ou enzimas e torna esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos” (SANTOS et al, 2012, p. 1005).

Figura 2 - Estrutura da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Santos et al., 2012, p. 1007

De acordo com Rosillo-Calle et al. (2005), a maioria das plantas possui cerca de 40 a 50% de celulose, 20 a 40% de hemicelulose e o restante de lignina.

Sendo o biopolímero presente em maior abundância em nosso planeta, segundo Zhang (2008), a celulose ($(C_6H_{10}O_5)_n$) é formada por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) que unem inúmeras moléculas de D-glicose, posicionadas a 180° umas em relação às outras, formando uma estrutura rígida insolúvel em água e em muitos solventes, sendo também resistente à tensão.

A hemicelulose é formada por vários polissacarídeos, formados pelos monômeros D-arabinose, D-galactose, D-glucose, D-manose, D-xilose e os ácidos D-glucurônico e 4-O-metil-glucurônico. Interage com a celulose a partir de suas ramificações, tornando o agregado mais estável e flexível, de acordo com Santos et al (2012).

Para Kumar et al (2009), o responsável pela dificuldade de se hidrolisar a celulose, devido ao suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra ataques microbianos, é a lignina. Sendo um heteropolímero amorfo de complexa estrutura molecular, é formada por álcool coferílico, álcool p-cumarílico, álcool sinapílico e fenilpropanos que protegem as microfibrilas de celulose e cujas organização e composição variam para cada espécie.

A composição de algumas biomassas lignocelulósicas que podem ser utilizadas na obtenção de etanol de segunda geração é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química de biomassas lignocelulósicas

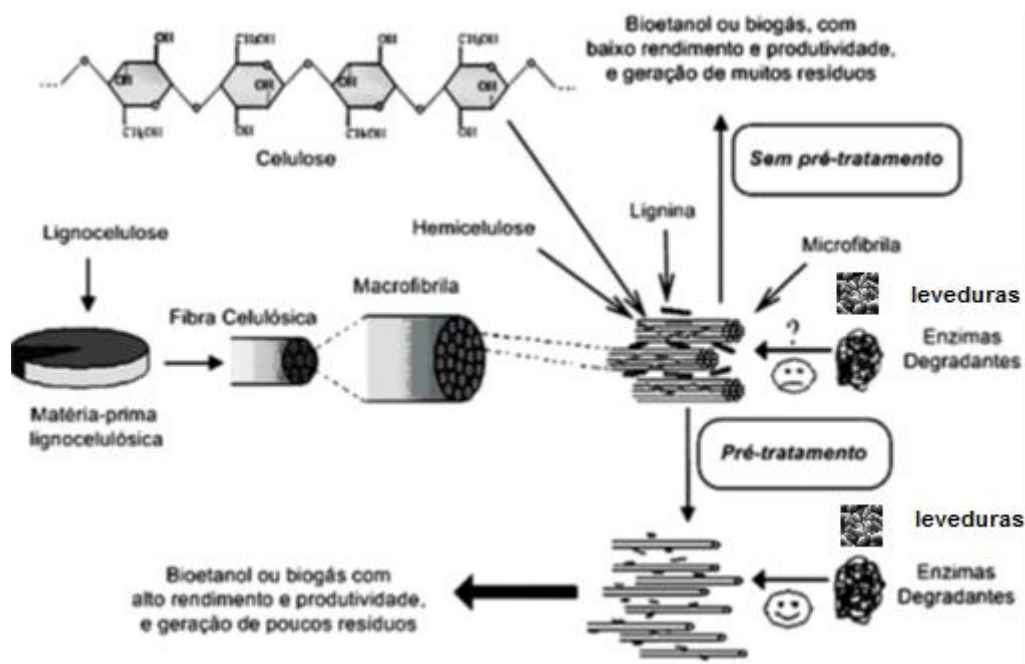
Biomassa Lignocelulósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha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

Fonte: Santos et al, 2012. p. 1005.

3.2 PRÉ-TRATAMENTOS

A estrutura dos resíduos lignocelulósicos, por não conter monossacarídeos disponíveis para a bioconversão, dificulta a hidrólise, principalmente enzimática, para obtenção de açúcares fermentescíveis, prejudicando a obtenção de etanol de segunda geração. De acordo com Cardona, Quintero e Paz (2010), essa dificuldade do acesso de agentes hidrolíticos à celulose se deve principalmente à presença de lignina, associada à hemicelulose. Para a melhor conversão de açúcares em etanol, um pré-tratamento antes do processo se faz necessário, pois possibilita um aumento da porosidade da matéria-prima e da redução da cristalinidade da celulose, removendo lignina e hemicelulose, minimizando a demanda de energia, viabilizando assim a produção industrial para a obtenção de etanol lignocelulósico. A acessibilidade de enzimas degradantes na biomassa lignocelulósica está apresentada na Figura 3.

Figura 3 – Acessibilidade de enzimas degradantes em material lignocelulósico.



Fonte: Adaptação de Taherzadeh e Karimi (2008)

Segundo Silva, Silva Júnior e Pinto Júnior (2010), os pré-tratamentos podem ser físicos, químicos, físico-químicos ou biológicos. A escolha de um deles se deve à área da superfície de acesso para as enzimas, índice de cristalinidade da celulose, interações entre celulose-hemicelulose-lignina e custo. Alguns pré-tratamentos têm suas características apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Pré-tratamentos de biomassas lignocelulósicas

Método	Processo	Modificações na biomassa	Observações notáveis
Pré-tratamentos físicos	Moagem: - com esferas - com dois rolos - martelo - coloidal - vibro-energia	- Aumento na área de superfície acessível e do tamanho do poro - Diminuição da cristalinidade da celulose - Redução do grau de polimerização	- A maior parte dos métodos são altamente exigentes de energia - A maioria deles não é possível remover a lignina - É preferível não usar esses métodos para aplicações industriais - Produtos químicos não são necessários para estes métodos
	Irradiação: - de raios gama - feixe de elétrons - micro-ondas		
	Outros: - hidrotérmico - alta pressão de vapor - expansão - extrusão - pirólise		
Pré-tratamentos químicos e físico-químicos	Explosão: - a vapor - de fibra de Amônia (AFEX) - CO ₂ - SO ₂	- Aumento na área de superfície acessível - Deslignificação parcial ou quase completa - Diminuição da cristalinidade de celulose - Redução do grau de polimerização - Hidrólise parcial ou completa de hemiceluloses	- Estes métodos estão entre os mais eficazes e incluem os processos mais promissores para aplicações industriais - Taxa de tratamento geralmente rápida - Normalmente precisam de condições extremas - Existem exigências químicas
	Alcalino: - Hidróxido de sódio - Amônia - Sulfato de amônia Ácido: - Ácido sulfúrico - Ácido clorídrico - Ácido fosfórico Gás: - Dióxido de cloro - Dióxido de nitrogênio - Dióxido de enxofre Agentes oxidantes: - Peróxido de hidrogênio - Oxidação molhada - Ozônio		
Pré-tratamentos biológicos	Extração da lignina por solvente: - Etanol-água - Benzeno-água - Etilenoglicol - Butanol-água - Agentes inchaço	- Deslignificação - Redução do grau de polimerização da celulose - Hidrólise parcial de hemicelulose	- Baixa exigência de energia - Nenhuma exigência química - Condições ambientais amenas - Muito baixa taxa de tratamento - Não considerar para aplicação comercial
	fungos e actinomicetos		

Os pré-tratamentos físicos são utilizados para aumentar a superfície de contato entre a celulose e a enzima. Entre eles estão:

- Moagem – modifica o grau de cristalinidade do material, mudando a estrutura do mesmo, através da redução do tamanho de suas partículas. As moagens podem ser com martelo, coloidal, por bolas ou compressão, segundo Silva; Silva Júnior; Pinto Júnior (2010). Entre suas desvantagens estão a dificuldade de remoção de lignina e o grande consumo de energia.
- Irradiação – as cadeias glicosídicas da celulose são dissociadas da lignina, mas não deve ser em altas doses, para evitar a degradação dos açúcares. Taherzadeh e Karimi (2008) explanam que neste processo podem ser utilizados raios gama, micro-ondas ou feixe de elétrons. Possui a desvantagem de ser um processo de alto custo.
- LHW (Liquid Hot Water) – Agbor et al (2011) descrevem que esse pré-tratamento que injeta de água a elevadas temperaturas (mas não vapor) sobre alta pressão na biomassa hidrata a celulose, penetrando em suas fibras, removendo parte da lignina e hemicelulose.
- Explosão a vapor – “Explosão a vapor é hoje visto como um dos melhores e de custo eficaz para os processos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica” (CHIARAMONTI et al, 2012). Emprega-se vapor saturado em alta pressão (180-220° C e 1-2,3 MPa) por um pequeno intervalo de tempo e repentinamente proporciona-se uma descompressão que permite um rompimento da estrutura da biomassa, possibilitando o acesso de enzimas para a hidrólise do material.

Pré-tratamentos físico-químicos e químicos também são muito promissores, pois são mais rápidos e efetivos, embora utilizem reagentes químicos e condições severas de tratamento. Os mais comuns são:

- Explosão – também denominado craqueamento ou auto-hidrólise. Segundo Chiaramonti et al (2012), ele caracteriza-se por submeter a biomassa a líquidos a altas temperaturas ou vapores a elevadas pressões, por determinado tempo e, em seguida, utilizando a descompressão. A explosão por vapor é normalmente catalisada por dióxido de enxofre, tornando o processo mais rápido e menos corrosivo, mas é altamente tóxico. O ácido sulfúrico também pode ser utilizado como catalisador, reduzindo o tempo e a temperatura de exposição, reduzindo a formação de substâncias inibidoras. O AFEX (Ammonia Fiber Explosion) utiliza a amônia, que é praticamente toda reutilizada no processo, a biomassa decomposta é formada apenas por fase sólida, facilitando a separação. Outra vantagem é a não formação de compostos inibidores da hidrólise, mas não deve ser utilizado em

biomassa com pequena quantidade de lignina. Vale ressaltar ainda a utilização de dióxido de enxofre (SO₂) e dióxido de carbono supercrítico (CO₂) como explosões também.

- Alcalino – de acordo com Brodeur et al (2011), os tratamentos alcalinos utilizam menores temperaturas que o tratamento por explosão, maiores concentrações de bases e maior tempo. Entre as bases mais utilizadas estão hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂). Além da redução da cristalinidade do material (principalmente em resíduos agrícolas), redução do grau de polimerização e aumento de superfície, promovem a separação entre lignina e carboidratos.
- Ácido – para Joshi et al (2011) esse pré-tratamento entre os processos mais comuns das últimas décadas. Utilizando-se ácido diluído (H₂SO₄, HNO₃, HCl), este processo hidrolisa a hemicelulose, mas os sólidos residuais ainda contêm lignina e celulose, que deve ser hidrolisada por celulasas. Como desvantagens estão a baixa concentração de açúcares na fase líquida e a produção de subprodutos inibidores da fermentação, entre eles furfural e derivados de ácido acético. Se a concentração de ácido e a temperatura são elevadas, para aumentar a concentração de açúcares, pode haver uma grande degradação de açúcares redutíveis, assim como equipamentos resistentes à corrosão devem ser adquiridos e muitas vezes a calagem também é necessária, elevando-se os custos deste tratamento.
- Organosolv – pré-tratamento capaz de solubilizar hemicelulose e lignina utilizando solventes orgânicos à temperaturas entre 100°C e 250°C, segundo Zhao, Cheng e Liu (2009). Tem como vantagens a recuperação destes por destilação, assim como a recuperação da lignina, mas a utilização de equipamentos para alta pressão encarece o processo. Entre os solventes mais empregados estão o metanol, etanol, acetona, etileno glicol e trietileno glicol e álcool tetra-hidrofurfúrico.
- Agentes oxidantes – emprega-se o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para facilitar a hidrólise enzimática, dissolvendo componentes da biomassa lignocelulósica. A oxidação úmida é outro tipo, na qual “os materiais são tratados com água e ar ou oxigênio” (SILVA; SILVA JÚNIOR; PINTO JÚNIOR, p. 65, 2010). Promissor também é o emprego do ozônio na oxidação, pois não há formação de subprodutos tóxicos, mas ainda é um processo caro.

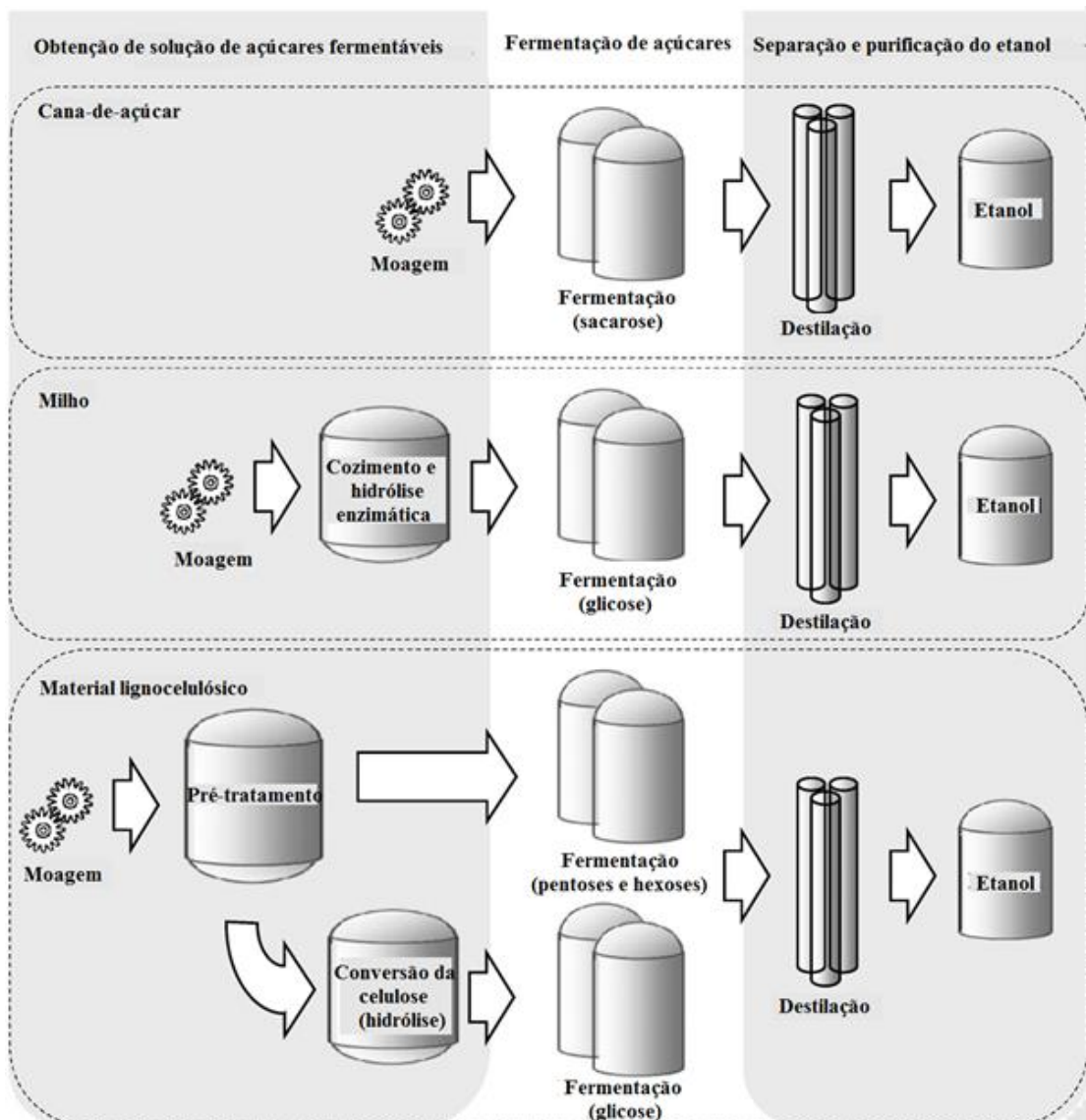
Os pré-tratamentos biológicos, segundo Cardona, Quintero e Paz (2010), utilizam principalmente fungos como os da classe *Basidiomycetes*, *Penicillium echinalatum*, *Phlebia* sp. MG-60, *Phanerochaete chrysosporium* ME-466, entre outros, que apresentam capacidade

de degradação da biomassa lignocelulósica, embora esse processo apresente baixo consumo de energia, ainda é muito lento.

3.3 PROCESSOS PARA OBTENÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

A produção de etanol é obtida a partir da obtenção de uma solução de açúcares fermentáveis, que após a fermentação, passam por etapas de separação e purificação do etanol. Mussato et al. (2010) destacam que o processo de obtenção de solução de açúcares fermentáveis é que diferenciara o processo de produção de etanol a partir de açúcares simples, daqueles que utilizam amido ou biomassa lignocelulósica, como representado na Figura 4.

Figura 4 – Etapas para obtenção de etanol a partir de diferentes matérias-primas.

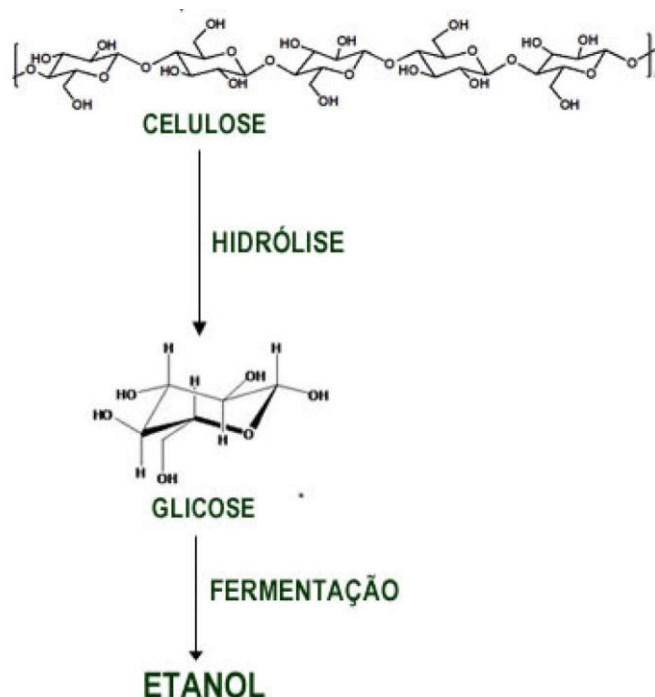


O processo de obtenção do etanol a partir da cana-de-açúcar consiste na extração do caldo que é fermentado, destilado e purificado. A utilização do milho para produção de etanol necessita do cozimento, para que o amido seja gelatinizado, sendo sacarificado (hidrolisado) antes da fermentação, também segundo Mussato et al. (2010).

Devido às etapas mais complexas, o custo de produção do etanol lignocelulósico se torna mais elevado. É necessário pré-tratar a biomassa, na qual pode-se ou não remover a lignina, hidrolisar os açúcares, podendo obter apenas as hexoses (açúcares com seis carbonos hidrolisados a partir da celulose) ou juntamente as pentoses (açúcares de cinco carbonos hidrolisados a partir da hemicelulose), seguida de fermentação. A fermentação das hexoses (glicose) é realizada em condições mais amenas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, já as pentoses “[...] é interessante utilizar os micro-organismos capazes de converter também esses açúcares em etanol, tais como leveduras do gênero *Candida* e *Pichia*, ou *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificado [...]” (MUSSATO et al., 2010, p.820, tradução nossa). As etapas seguintes são as mesmas dos outros materiais até a obtenção do etanol.

Neste trabalho, a obtenção de etanol de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica de interesse, consiste em hidrolisar a celulose, transformando-a em glicose, e a fermentação do açúcar, gerando etanol, conforme Figura 5.

Figura 5 – Representação esquemática da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.



Fonte: Santos et al., 2012, p. 1005

Os processos de conversão de celulose em etanol são diferenciados principalmente quanto aos métodos de hidrólise e fermentação, estágios esses que estão menos amadurecidos tecnologicamente e são mais específicos à produção de etanol. Os processos de hidrólise podem ser divididos em duas categorias: aqueles que usam ácidos minerais, como, por exemplo, o ácido sulfúrico, e os que usam enzimas, os complexos celulase (ROSILLO-CALLE et al., 2005, p. 385).

O método comumente empregado desde o início do século XX é a hidrólise ácida, que libera açúcares fermentáveis para a fermentação. De acordo com Kosaric e Vadar-Sukan (2001), este processo pode ocorrer com ácidos concentrados a baixas temperaturas ou ácidos menos concentrados a altas temperaturas.

A hidrólise utilizando ácidos concentrados apresenta alta taxa de conversão de celulose em glicose, mas como inconveniente são formados subprodutos oriundos da degradação da glicose. “A celulose cristalina é completamente solúvel em 72% de H₂SO₄ ou soluções de HCl a 42% a temperaturas relativamente baixas (10–45° C)” (KOSARIC e VADAR-SUKAN, 2001, p. 133). Despolimeriza a celulose em oligossacarídeos, reduz a concentração do ácido e aumenta a temperatura, transformando os oligossacarídeos em monômeros (glicose). As desvantagens da utilização de ácidos concentrados são o custo para recuperação do ácido e necessidade de equipamentos resistentes à corrosão. O emprego de ácido diluído não é tão vantajoso, devido à resistência de degradação da celulose pela sua estrutura cristalina.

Outro método de hidrólise que visa aumento dos rendimentos é o enzimático. Esse método, para ser vantajoso, exige um pré-tratamento da biomassa, para facilitar a remoção da hemicelulose e lignina e diminuir a cristalinidade do material para ser hidrolisado. A enzima utilizada neste processo é a celulase, composta por um grupo de enzimas, apresentadas de várias formas.

“O mecanismo geral da hidrólise enzimática é baseado na ação de três celulasas distintas [...] e depende da proporção da concentração e adsorção destas enzimas” (SILVA; SILVA JÚNIOR; PINTO JÚNIOR, 2010, p.66). As etapas da hidrólise enzimática se dividem em: “1. Decomposição das ligações glicosídicas pelas enzimas endo-β-gluconases; 2. Ataque sinérgico das enzimas endo-β-gluconases e exo-β-gluconases e 3. Catálise da hidrólise dos oligossacarídeos pelas enzimas β-glicosidases” (SILVA; SILVA JÚNIOR; PINTO JÚNIOR, 2010, p.66)

Segundo Balat, Balat e Oz (2008), as vantagens da hidrólise enzimática são baixas temperaturas empregadas (318-323 K), pequena formação de subprodutos, pois as enzimas catalisam reações específicas e custo equiparado ao da hidrólise ácida. Após a hidrólise, fermenta-se o açúcar produzido e, então, obtém-se o etanol.

A hidrólise enzimática pode ocorrer ou não simultaneamente à fermentação. O processo no qual as reações acontecem separadamente, ou seja, em unidades diferentes, é denominado SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation). Idi e Mohamad (2011) destacam que a vantagem deste processo é que cada etapa trabalhe nas suas condições ótimas de funcionamento, como tempo de reação, temperatura, pH, dosagem de enzima, entre outros. No entanto, açúcares liberados pela hidrólise podem inibir a ação das celulasas (inibição por produto), afetando o rendimento do processo.

A hidrólise enzimática é realizada por celulasas (endoglucanase e exoglucanase), que quebram a celulose em celobiose, e esta é, subsequentemente, convertida em duas moléculas de glicose pela β -glucosidase. Entretanto, a atividade da endoglucanase é inibida pela celobiose e a da β -glucosidase pela glicose (SANTOS et al., 2010, p. 904).

Visando evitar a inibição da ação enzimática pelos açúcares, o processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) tem sido estudado. Neste, a hidrólise e fermentação ocorrem num mesmo vaso, ou seja, celulasas e micro-organismos são adicionados simultaneamente ao substrato e à medida que a glicose é produzida, é rapidamente consumida pela levedura, produzindo etanol, aumentando a conversão e, portanto, maior eficiência do processo. As condições de trabalho, segundo Santos et al. (2010), devem ser intermediárias, pois a temperatura ótima para hidrólise é aproximadamente 55°C e para a fermentação 30°C, assim como a agitação não deve ser muito vigorosa, pois o *Saccharomyces cerevisiae* opera em condições anaeróbicas.

Outra vantagem do processo SSF, de acordo com Olofsson, Bertilsson & Lidén (2008), é a utilização de uma menor quantidade de levedura. Esse fato se deve à presença do etanol no caldo, que dificulta o ataque das leveduras por micro-organismos não desejáveis. Existem desvantagens no processo SSF em relação ao SHF, entre elas a não utilização da temperatura ótima da hidrólise, pois inibiriam a ação das leveduras, cuja temperatura ótima é bem inferior, além da dificuldade em se reutilizar a levedura, devido a problemas de separação pela presença da lignina.

As reações, segundo Philippidis, Smith e Wyman (1993), seguem os seguintes passos:

- a endogluconase e exogluconase promovem a hidrólise da celulose para celobiose, podendo-se negligenciar nesta fase a formação de glicose;
- a β -glucosidase hidrolisa a celobiose para glicose;
- as leveduras fermentam a glicose, obtendo-se assim, o etanol.

“Os requisitos gerais de um organismo para ser utilizado na produção de etanol é que deve dar um rendimento elevado de etanol, uma produtividade elevada e capacidade de

resistir a altas concentrações de etanol a fim de manter baixos os custos de destilação”(OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008, p.5, tradução nossa).

Muitos pesquisadores estão modificando micro-organismos a fim de que eles possam fermentar de maneira eficiente açúcares de cinco e seis carbonos (pentoses e hexoses) em apenas um vaso, sendo este processo denominado sacarificação simultânea e co-fermentação (SSCF). Para utilização de mais de um micro-organismo, Idi e Mohamad (2011) sugerem que eles sejam compatíveis nas condições de operação, como pH e temperatura. Esse processo ainda está sendo estudado a fim de melhorar sua eficiência.

Existe também o processo cuja denominação é conversão microbiana direta (CMD) ou bioprocesso consolidado (CBP), no qual ocorrem em um único vaso a produção de enzimas, a hidrólise da celulose e a fermentação de açúcar, no entanto, apresenta rendimentos inferiores à SHF e à SSF. “No entanto, nenhum organismo disponível na indústria é capaz de produzir celulasas ou outras enzimas degradantes da parede celular células que degradam a para a produção de etanol com altos rendimentos” (DOGARIS; MAMMA; KEKOS, 2013, p. 1459). Entre os fungos utilizados no processo são do gênero *Neurospora*, *Fusarium*, *Aspergillus* entre outros.

4 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a preocupação com os impactos ambientais relacionados ao consumo de combustíveis fósseis e a necessidade de se gerar energia através de recursos renováveis, faz-se necessário estudar o aproveitamento de materiais alternativos, visando à produção de energia limpa e a redução de poluentes na atmosfera.

Uma das maneiras de se alcançar esses objetivos é a produção de energia através da biomassa, abundante em nosso planeta. O uso de resíduos de biomassa é uma alternativa que tem reduzido impacto ambiental, entre eles o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, presentes em grande escala em nosso país, devido à atividade da indústria sucroalcooleira. Além da produção direta de energia, pela queima dos resíduos, a produção de etanol de segunda geração, a partir da sacarificação e fermentação de biomassa lignocelulósica é uma das alternativas para produção de energia com menor impacto ambiental, além de não prejudicar a produção de alimentos.

Para viabilizar o processo, existe a necessidade de se reduzirem custos industriais, tornando necessário simular os processos e encontrar seu ponto de ótimo, para então, reproduzi-lo em pequena e posteriormente, larga escala, justificando a proposta do presente trabalho de simular o processo de sacarificação e fermentação simultâneas da biomassa lignocelulósica.

5 METODOLOGIA

O processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) é um dos mais estudados para a produção de etanol de segunda geração. De acordo com Elumalai e Thangavelu (2010), esse processo apresenta uma série de vantagens, entre elas a rápida conversão de glicose em etanol, evitando a inibição da celulase pelo produto intermediário, assim como a presença do etanol dificultar o ataque de leveduras por bactérias. O resultado deste processo são rendimentos mais elevados e maiores concentrações de etanol que outros processos.

A metodologia a ser empregada neste projeto é o estudo da cinética do processo SSF em reator batelada já desenvolvidos na literatura, sua simulação através da elaboração de um software, a otimização do processo e comparação do processo de SSF em reator batelada e contínuo.

5.1 ESTUDO DO PROCESSO SSF EM REATOR BATELADA

Shen e Agblevor (2010) afirmam que os modelos para SSF anteriores ao desenvolvido por eles não simulavam todas as variáveis envolvidas – celulose, celobiose, glicose e etanol. Além disso, não eram consideradas alterações na concentração de micro-organismos, sendo necessário acrescentar essas alterações para que o modelo fosse viável economicamente.

As equações do processo de SSF em reator batelada desenvolvida pelos autores acima, iniciam-se com a conversão de celulose em celobiose (desprezando-se a formação direta em glicose) e celobiose em glicose, como representada pela Equação 10:



Como citado anteriormente, a reação celulose-celobiose é catalisada pelas enzimas endogluconase e exogluconase, enquanto a reação celobiose-glicose é catalisada pela β -glucosidase, cujas taxas de reação são $r_1 \left(\frac{g}{l.h}\right)$ e $r_2 \left(\frac{g}{l.h}\right)$, apresentadas pelas Equações 2 e 3, respectivamente. O produto final da reação inibe a ação das primeiras enzimas.

$$r_1 = \frac{k_1 \cdot C}{1 + \frac{G}{K_{1G}} + \frac{B}{K_{1B}}} \quad (2)$$

$$r_2 = \frac{k_2 \cdot B}{1 + \frac{G}{K_{2G}}} \quad (3)$$

As variáveis são:

C – concentração de celulose (g/l)

B – concentração de celobiose (g/l)

G – concentração de glicose (g/l)

e – concentração de enzima ativa (g/l)

k_2 – constante da taxa específica da hidrólise de celobiose para glicose (h^{-1})

K_{1G} – constante de inibição da glicose e celobiose para endo-glucanase (g/l)

K_{1B} – constante de inibição da glicose e celobiose para exo-glucanase (g/l)

K_{2G} – constante de inibição da glicose para glucosidase (g/l)

k_1' – variável associada à desativação da enzima (h^{-1})

Como existe a desativação da enzima na reação celulose-celobiose, Shen e Agblevor (2010) transformaram o termo k_1' como o produto da constante da taxa específica pela concentração de enzima, conforme pela Equação 4:

$$k_1' = k_1 \cdot e \quad (4)$$

Sendo k_1 a constante da taxa específica da hidrólise de celulose para celobiose $\left(\frac{l}{\text{enzima} \cdot h}\right)$.

Assim, substituindo-se a Equação 4 na Equação 2, tem-se a Equação 5

$$r_1 = \frac{k_1 \cdot e \cdot C}{1 + \frac{G}{K_{1G}} + \frac{B}{K_{1B}}} \quad (5)$$

Foi desprezada a desativação da gluconase, pois não houve reação sólido-líquido da glucosidase na celulase.

Os autores acima citados seguiram o modelo de Monod para o crescimento de células, sendo a taxa de crescimento das células de levedura (inóculo) dada por:

$$r_X = \mu \cdot X = \frac{\mu_m \cdot X \cdot G}{K_G + G} \quad (6)$$

Na Equação (6) tem-se:

μ – taxa específica de crescimento de células (h^{-1})

μ_m – taxa específica máxima de crescimento de células (h^{-1})

K_G – constante de saturação da glicose para o crescimento microbiano (g/l)

X – concentração de células (g/l)

G – concentração de glicose (g/l)

Nesta equação, a taxa de morte de células foi desprezada, pois seu acréscimo não influencia significativamente a equação da taxa de crescimento de células.

A taxa de reação para a glicose é representada pela Equação 7:

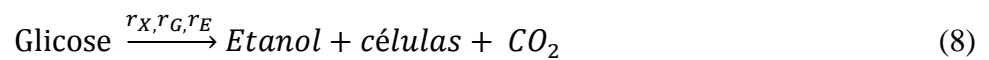
$$r_G = \frac{r_X}{Y_{X/G}} + m \cdot X \quad (7)$$

As constantes são:

m – coeficiente de manutenção do metabolismo dos micro-organismos (h^{-1})

$Y_{X/G}$ – coeficiente de rendimento de massa de células em glicose (g/g)

Finalizada a etapa de transformação de celulose em açúcar fermentável, segue a equação de formação do produto, concomitante com o crescimento de células, representadas na Equação 8.



A taxa de formação do etanol é

$$r_E = \frac{k_3 \cdot r_X}{Y_{X/E}} = \frac{k_3 \cdot r_X}{Y_{X/G}} \quad (9)$$

As constantes empregadas na Equação 9 foram:

$k_3 = k_3' \cdot Y_{E/G}$ – coeficiente de formação do produto associado ao crescimento de células (adimensional)

$Y_{X/E}$ – coeficiente estequiométrico de conversão de células a partir do etanol

$Y_{\frac{X}{G}}$ – coeficiente estequiométrico de conversão de células a partir da glicose

$Y_{\frac{E}{G}}$ – coeficiente estequiométrico de conversão do etanol a partir da glicose

E – concentração de etanol (g/l)

Devido à ineficaz adsorção das enzimas endogluconase e exocelobiohidrolase sobre o substrato sólido, não se pode desprezar a desativação enzimática, como destacado na Equação 10.



e_e – concentração de endogluconase e exocelubiohidrolase (g/l)

k_4' – constante da taxa específica de desativação enzimática $\left(\frac{l}{g.h}\right)$

$e_e C_{in}^*$ – complexo ineficiente formado pelas enzimas e substrato (g/l)

A taxa de formação deste complexo é expressa por:

$$\frac{de_e C_{in}^*}{dt} = - \frac{de_e}{dt} = k_4' \cdot e_e^2 \quad (11)$$

A concentração total de enzimas é proporcional à concentração da endogluconase e exocelobiohidrolase, ou seja, $e_e = f \cdot e$, sendo f uma constante de proporcionalidade. Como $k_4 = f \cdot k_4'$, a Equação 11 pode ser escrita como

$$\frac{de \cdot C_{in}^*}{dt} = - \frac{de}{dt} = k_4 \cdot e^2 \quad (12)$$

Na Equação 12, para as condições de contorno para $t = 0$, $e = e_0$ e para $t = t$, $e = e$, para t tendendo ao infinito, a concentração de enzima tende a zero, encontra-se a Equação 13

$$e = \frac{e_0}{1 + k_4 \cdot e_0 \cdot t} \quad (13)$$

Considerou-se que a cinética de SSF depende apenas do tempo, pois os efeitos de transferências de massa internas e externas na reação enzimática e metabolismo de microorganismos podem ser desconsiderados. Dessa maneira a taxa de variação da concentração global da celobiose é

$$\frac{dB}{dt} = \frac{r_1}{0,947} - r_2 = \frac{k_1 \cdot e \cdot C}{0,947 \cdot \left(1 + \frac{G}{K_{1G}} + \frac{B}{K_{1B}}\right)} - \frac{k_2 \cdot B}{1 + \frac{G}{K_{2G}}} \quad (14)$$

Na Equação 14, o valor 0,947 refere-se ao fator de conversão de duas unidades de glucano na celulose para celobiose.

Substituindo-se e da Equação 13 na Equação 14, tem-se a Equação 15:

$$\frac{dB}{dt} = \left[\frac{k_1 \cdot C}{0,947 \cdot \left(1 + \frac{G}{K_{1G}} + \frac{B}{K_{1B}}\right)} \right] \left(\frac{e_0}{1 + k_4 \cdot e_0 \cdot t} \right) - \frac{k_2 \cdot B}{1 + \frac{G}{K_{2G}}} \quad (15)$$

A taxa geral de variação da concentração de glicose, com fator de conversão da celobiose para duas moléculas de glicose 0,95, é representada pela Equação 16

$$\frac{dG}{dt} = \frac{r_2}{0,95} - r_G = \frac{k_2 \cdot B}{0,95 \cdot \left(1 + \frac{G}{K_{2G}}\right)} - \frac{\mu_m \cdot X \cdot G}{(K_G + G) \cdot Y_X \frac{X}{G}} - m \cdot X \quad (16)$$

Na Equação 17, tem-se a taxa de variação da concentração de células.

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m \cdot X \cdot G}{K_G + G} \quad (17)$$

A taxa de variação da concentração do etanol é expressa pela Equação 18

$$\frac{dE}{dt} = \frac{k_3 \mu_m \cdot X \cdot G}{(K_G + G) \cdot Y_X \frac{X}{G}} \quad (18)$$

Para finalizar, a concentração de celulose é dada pela Equação 19:

$$C = C_0 - 0,9 \cdot G - 0,947 \cdot B - 0,9 \cdot \frac{E}{0,511} - 1,137 \cdot (X - X_0) \quad (19)$$

Na Equação 19, o valor 0,9 é o fator de conversão de uma unidade de glucano da celulose para glicose, o fator de conversão inversa de glicose para etanol é 0,511 e 1,137 é o fator de conversão de celulose consumida para produzir levedura.

Substituindo a Equação 19 na Equação 16, obtém-se a Equação 20

$$\frac{dB}{dt} = \frac{k_1 \cdot \left[C_0 - 0,9 \cdot G - 0,947 \cdot B - 0,9 \cdot \frac{E}{0,511} - 1,137 \cdot (X - X_0) \right]}{0,947 \cdot \left(1 + \frac{G}{K_{1G}} + \frac{B}{K_{1B}}\right)} \cdot \left(\frac{e_0}{1 + k_4 \cdot e_0 \cdot t} \right) - \frac{k_2 \cdot B}{1 + \frac{G}{K_{2G}}} \quad (20)$$

Os parâmetros utilizados nas equações anteriores foram adotados de Shen e Agblevor (2010) e são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros do modelo SSF para produção de etanol de segunda geração

Parâmetros								
k_1	k_2	k_3	k_4	K_{1G}	K_{2G}	K_G (g/l)	m	k_1
(l/(g h))	(h ⁻¹)	(-)	(l/(g h))	(g/l)	(g/l)		((h ⁻¹)	(l/(g h))
0.6096	3.202	3.024	0.0997	0.1768	16.25	3.399	0.6420	0.1768

Fonte: Adaptação Shen; Agblevor. 2010, p. 676

5.2 SIMULAÇÃO DO PROCESSO SSF

Processos químicos costumemente possuem alto custo para serem reproduzidos em laboratório. Esse custo, além dos respectivos materiais, engloba também tempo e desperdício de reagentes.

Garcia (2005, p. 20) define simulação como “[...] a obtenção da resposta temporal das variáveis de interesse (variáveis dependentes) de um modelo, quando se excita suas variáveis de entrada com sinais desejados e se definem os valores das condições iniciais das variáveis dependentes”, ou seja, a simulação, ou também denominada simulação computacional de sistemas, emprega técnicas matemáticas para reproduzir o funcionamento de um projeto ou processo, controlar sistemas, otimizar condições de um processo, entre outras.

Entre seus benefícios estão a busca da eficiência de projetos em desenvolvimento, assim como economia de recursos e tempo, pois ajustes podem ser feitos para trazer ganhos na produtividade, assim como qualidade do produto.

Elaborou-se um software para a simulação do processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas de biomassa lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração, utilizando a linguagem Matlab. Segundo Gilat (2006), o Matlab é uma importante ferramenta para cálculos matemáticos, simulações, modelagens, gráficos, muito utilizado no meio acadêmico e também na indústria, como ferramenta de pesquisa.

O software reproduz o processo de fermentação e sacarificação simultâneas (SSF) de materiais lignocelulósicos, a partir das Equações 16, 17, 18 e 20 que descrevem a cinética do processo em reator batelada, sob condições de temperatura, pH e agitação iguais a 36°C e 4,8 e 300 rpm, respectivamente, reproduzindo o modelo descrito por Shen e Agblevor (2010). A celulose empregada é a celulose microcristalina (Avicel PH 101), a enzima do processo é o complexo celulase Enzima Novozymes NS50052, com atividade de 97 FPU/g (inicialmente

utilizada 4 g/l da mesma com carga de enzima de 9,7 FPU/g substrato), o inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* da coleção do ATCC, com concentração inicial de 0,3 g/l.

Dutta (2008) menciona que FPU é a denominação de unidade de papel de filtro, ou seja, unidade utilizada para determinação da atividade enzimática da celulase. Uma unidade internacional de enzima (UI) é a força para catalisar 1 μ moles de substrato por minuto. É comum se utilizar papel de filtro como substrato para determinação da atividade da celulase, pois tem peso molecular definido e seus resultados podem ser reproduzidos, assim a unidade FPU refere-se à atividade enzimática da celulase.

O método utilizado no software para a resolução do sistema de quatro equações diferenciais ordinárias acima citadas foi o Runge-Kutta que, de acordo com Campos Filho (2007), apresenta melhor exatidão, com menor exigência de grande esforço computacional, por ser um método de passo simples, utilizando somente derivadas de primeira ordem.

As variáveis de entrada do software são concentrações iniciais de celulose, enzima, células e tempo de processo, utilizando-se inicialmente as mesmas utilizadas por Shen e Agblevor (2010), cujos valores são:

C_0 – concentração inicial de substrato = 40 g/l

X_0 – concentração inicial de células 0,3 g/l,

e_0 – concentração inicial de enzima 4 g/l,

t – tempo do processo de 0 a 80 h.

A finalidade de se reproduzir o experimento Shen e Agblevor (2010) é validá-lo, assim como, encontrar, a partir dele, condições que otimizem o processo, assim como comparar as concentrações das variáveis de saída por meio gráfico.

As variáveis de saída foram concentrações (g/l):

- ✓ celobiose (B),
- ✓ glicose (G),
- ✓ células (X)
- ✓ etanol (E).

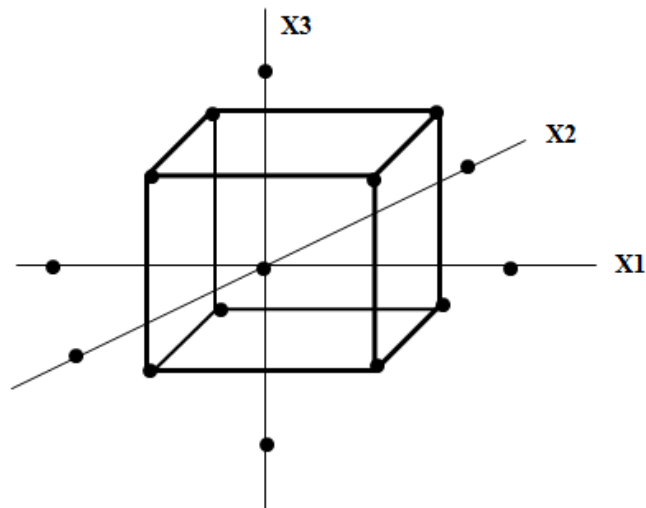
A partir da reprodução dos dados do modelo adotado, o software pôde ser aprimorado para se simular diferentes concentrações iniciais de celulose, enzima e células, todas em g/l, assim como variar o tempo de reação, em horas.

5.3 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

Para se medir a influência de variáveis em vários níveis sobre um processo, assim como prever a interação entre elas, utiliza-se comumente planejamento fatorial 2^k . Neste caso, são três fatores (concentrações de celulose, células e enzima) e dois níveis (máximo e mínimo). Para melhorar a análise da superfície de resposta, Calado e Montgomery (2003, p.120) indicam o Planejamento Composto Central “[...] quando se quiser verificar a curvatura de um plano, ou seja, quando se quiser verificar a existência de termos quadráticos no modelo de regressão”.

Assim, através da inserção de pontos axiais por um parâmetro α e ponto central, proporcionam rotabilidade à superfície de resposta, determinando uma região esférica de interesse, para que se possam determinar os valores das variáveis independentes que proporcionam o valor máximo e mínimo da variável de resposta, permitindo através de poucos ensaios que se otimize o processo, como exemplificado na Figura 8.

Figura 6 – Esquema de um DCCR com 8 pontos fatoriais + ponto central + 6 pontos axiais.



Fonte: Rodrigues e Iemma (2005, p. 117)

No Planejamento Composto Central os pontos centrais utilizados foram:

- ✓ Concentração de celulose – 40,0 g/l
- ✓ Concentração de células (inóculo de levedura) – 0,3 g/l
- ✓ Concentração de enzima – 4,0 g/l

Os intervalos utilizados para as variáveis foram C_0 (20 g/l), X_0 (0,1 g/l) e e_0 (1,0 g/l).

As variáveis concentração inicial de celulose, concentração inicial de enzima e concentração inicial de células foram substituídas por valores codificados x_1 , x_2 e x_3 , respectivamente.

Segundo Rodrigues e Iemma (2005), quando os pontos de valores axiais codificados do parâmetro $\pm \alpha$ são calculados pela Equação 21

$$\alpha = (2^k)^{\frac{1}{4}} \quad (21)$$

o planejamento passa a ser chamado de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Como $k = 3$, o parâmetro α adotado foi aproximadamente 1,68.

Os valores originais das variáveis foram calculados através dos valores codificados ± 1 , $\pm 1,68$ e 0, pela Equação 22:

$$V_c = \frac{V_o - P_c}{I_n} \quad (22)$$

V_c = valor codificado da variável

V_o = valor original da variável

P_c = ponto central

I_n = intervalo entre V_o e P_c

Os dados foram tabelados e tratados pelo software Statistica 8, da Statsoft, para estudo dos efeitos das variáveis concentração inicial de celulose, concentração inicial de enzima e concentração inicial de células, em g/l, no processo SSF.

5.4 SIMULAÇÃO DO PROCESSO SSF EM REATOR CONTÍNUO

Para uma maior aplicabilidade do processo de produção de etanol de segunda geração, a partir dos resultados obtidos sobre as condições iniciais de um processo SSF em reator batelada, efetuou-se a simulação utilizando-se um reator contínuo (CSTR)

Segundo Brethauer e Wyman (2010), em sistema contínuo de fermentação, quando comparado ao batelada, oferece menor tempo de limpeza do vaso e menor tempo de

enchimento, facilitando o controle do estado estacionário, ou seja, pode-se utilizar reatores menores e assim, reduzir os investimentos.

“Numa operação contínua, o substrato (celulose) é continuamente alimentado na cultura a uma vazão F e o efluente contendo etanol, celulose residual, celobiose, glicose célula e enzima sai continuamente a uma mesma vazão F.” (SHEN e AGBLEVOR, 2010, p. 672, tradução nossa)

Para iniciar o processo, uma cultura deve estar presente previamente no reator. As equações da cinética do processo SSF em reator contínuo utilizadas para elaborar um simulador estão a seguir, iniciando pela equação global de variação da celobiose:

$$\frac{dB}{dt} = \frac{r_1}{0,947} - r_2 - D \cdot B + D \cdot B_1 \quad (23)$$

Na Equação 23, B_1 é a celobiose convertida em r_1 , D é a taxa de diluição, ou seja, F/V (h^{-1}), F é a taxa de alimentação (l/h) e V é o volume do reator (l).

$$B_1 = \frac{C_1 - C}{0,947} \quad (24)$$

As variáveis empregadas na Equação 24 são:

C – concentração de celulose na cultura

C_1 – concentração de celulose no fluxo de alimentação (g/l)

Substituindo-se a Equação 24 na Equação 23, tem-se a Equação 25

$$\frac{dB}{dt} = \frac{k_1 \cdot e \left[C_0 - 0,9G - 0,947B - 0,9 \cdot \frac{E}{0,511} - 1,139 \cdot (X - X_0) \right]}{0,947 \cdot \left(1 + \frac{G}{K_{1G}} \right)} + \frac{D}{0,947} \cdot \left[C_1 - \left(C_0 - 0,9G - 0,947B - 0,9 \cdot \frac{E}{0,511} - 1,139 \cdot (X - X_0) \right) \right] - \frac{k_2 B}{1 + \frac{G}{K_{2G}}} - D \cdot B \quad (25)$$

A taxa global de variação da glicose é representada pela Equação 26

$$\frac{dG}{dt} = \frac{r_2}{0,95} - r_G - DG = \frac{k_2 \cdot B}{0,95 \cdot \left(1 + \frac{G}{K_{2G}} \right)} - \frac{\mu_m \cdot X \cdot G}{(K_G + G) \cdot Y_X^G} - m \cdot X - DG \quad (26)$$

A Equação 36 representa a taxa global de variação da concentração de células.

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m \cdot X \cdot G}{K_G + G} - D \cdot X \quad (27)$$

As taxas de variação da concentração do etanol e concentração de enzimas são expressas pelas Equações 28 e 29

$$\frac{dE}{dt} = \frac{k_3 \mu_m \cdot X \cdot G}{(K_G + G) \cdot Y_X^E} - DE \quad (28)$$

$$\frac{de}{dt} = -k_4 e^2 + D(e_0 - e) \quad (29)$$

Utilizando-se também o método Runge Kutta para resolução de sistemas de equações diferenciais, elaborou-se um simulador para as mesmas condições de pH, temperatura e agitação empregadas, cujas variáveis de entrada são:

- ✓ C_0 – concentração inicial de celulose na cultura (g/l),
- ✓ C_1 – concentração de celulose no fluxo de alimentação (g/l),
- ✓ e_0 – concentração inicial de enzimas (g/l),
- ✓ X_0 – concentração inicial de células (inóculo de levedura) (g/l),
- ✓ D – taxa de diluição (h^{-1}),
- ✓ t – tempo do processo (h).

As variáveis de saída são concentrações de celobiose, glicose, células, etanol e enzimas, todas em g/l.

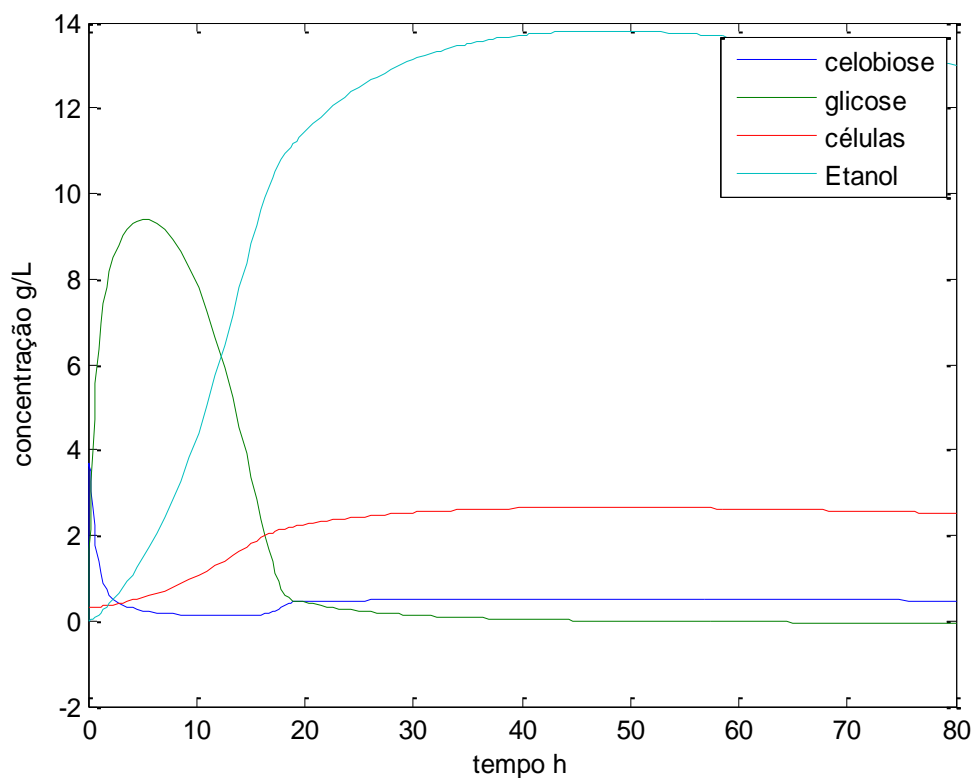
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 SIMULAÇÃO DO PROCESSO SSF EM REATOR BATELADA

O processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas de biomassa lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração em reator batelada modelado por Shen e Agblevor (2010) foi simulado no software elaborado em linguagem Matlab, utilizando como condições iniciais as concentrações iniciais de celulose (C_0) 40 g/l, enzimas 4 g/l (e_0), células (X_0) 0,3 g/l e tempo de reação de 80h, a fim de se reproduzir o processo experimental realizado pelos autores acima citados.

A Figura 7 representa a simulação nas condições citadas, cujas variáveis de saída foram as concentrações de celobiose, glicose, células e etanol.

Figura 7 – Gráfico da simulação do processo SSF em reator batelada de material lignocelulósico com concentrações iniciais (g/l) $C_0 = 40$, $X_0 = 0,3$, $e_0 = 4$ e tempo $t = 80$ h.



Pode-se notar inicialmente, na Figura 7, a formação de celobiose, que representa o início da hidrólise, assim como rápida formação de glicose. A concentração inicial de etanol era nula, foi aumentando com o tempo e começa a diminuir a partir de 48h, quando as concentrações de celobiose e glicose praticamente se anulam.

Próximo das 20 horas de processo observa-se um aumento na concentração de células, conseqüentemente, aumentou-se a velocidade da fermentação, produzindo-se assim, mais etanol.

Modificando-se o simulador em Matlab para que se possa simular a produção de etanol de segunda geração a partir dos dados iniciais: concentração inicial de celulose (C_0) de biomassa lignocelulósica pré-tratada, concentração inicial de enzima (e_0), concentração de células (inóculo de levedura) (X_0) e o tempo do processo, obtendo-se como dados de saída concentração de celobiose, de glicose, de células e de etanol, todos em g/l, analisou-se as condições ótimas do processo a partir de um Delineamento Composto Central Rotacional.

6.2 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

O Delineamento Composto Central Rotacional foi utilizado para analisar o efeito das variáveis concentrações iniciais de celulose, enzima e células no processo SSF em reator batelada para o tempo de 48h, assim como obter as condições ótimas do processo, utilizando-se o software Statistica 8.

A Tabela 4 apresenta 15 simulações, cujos valores das concentrações iniciais foram calculados a partir das variáveis codificadas x_1 , x_2 e x_3 , que representam respectivamente as concentrações iniciais de celulose, enzima e células, e da Equação 22. Os dados foram inseridos no software elaborado e obteve-se para cada simulação sua respectiva concentração final de etanol (g/l).

Tabela 4 – Simulação do Delineamento do Composto Central Rotacional para produção de Etanol de segunda geração a partir do processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas da biomassa lignocelulósica com 3 fatores (concentrações de celulose, enzima e células)

Simulações	x_1	x_2	x_3	C_0	e_0	X_0	E
1	-1	-1	-1	20	3	0,2	6,8750
2	1	-1	-1	60	3	0,2	19,2626
3	-1	1	-1	20	5	0,2	7,1979
4	1	1	-1	60	5	0,2	20,3436
5	-1	-1	1	20	3	0,4	6,8262
6	1	-1	1	60	3	0,4	19,8841
7	-1	1	1	20	5	0,4	7,103
8	1	1	1	60	5	0,4	20,7479
9	-1,68	0	0	6,4	4	0,3	2,1029
10	1,68	0	0	73,6	4	0,3	24,3463
11	0	-1,68	0	40	2,32	0,3	13,0954
12	0	1,68	0	40	5,58	0,3	14,1761
13	0	0	-1,68	40	4	0,132	13,4815
14	0	0	1,68	40	4	0,468	13,8941
15	0	0	0	40	4	0,3	13,8046

A Tabela 5 apresenta os efeitos ou interações entre as três variáveis simuladas do processo: concentrações iniciais de celulose, de enzima e de células.

Tabela 5 – Estimação dos efeitos das variáveis concentrações iniciais de celulose (C_0) enzima (e_0) e células (X_0) para produção de etanol lignocelulósico

	Efeito	Coefficiente
Mean/Interc.	13,80277	13,80277
(1)Co (L)	13,11355	6,55677
Co (Q)	-0,40127	-0,20064
(2)eo (L)	0,62416	0,31208
eo (Q)	-0,11055	-0,05527
(3)Xo (L)	0,24545	0,12272
Xo (Q)	-0,07374	-0,03687
1L by 2L	0,31128	0,15564
1L by 3L	0,31737	0,15869
2L by 3L	-0,04083	-0,02041

Através dos dados apresentados na Tabela 5, na coluna Efeitos, pode-se perceber que o termo linear (L) da variável C_0 tem a maior interferência (efeito) no processo SSF, enquanto seu termo quadrático (Q) tem interferência relativamente pequena.

Para a variável concentração inicial de enzima (e_0), o termo linear (L) é mais significativo que o termo quadrático (Q), sendo quase seis vezes maior. Considerando-se a variável concentração inicial de células (X_0), apresenta um efeito menor que o da concentração inicial de enzimas. Seu termo linear é quase três vezes menor comparado ao linear da concentração de enzimas, enquanto seu efeito quadrático é também pequeno.

A interferência da concentração já era esperada, pois quanto maior a concentração de substrato, maior a concentração de produto. O efeito da concentração inicial de enzimas é maior que o efeito da concentração inicial de células. Esses efeitos são representados nas superfícies de resposta e contorno apresentadas a seguir.

Nas Figuras 8 e 9, nota-se que para maiores concentrações de celulose e aumentando-se a concentração de enzimas, obtém-se maior quantidade de produto – etanol (g/l). Analisando as interações das duas variáveis, a concentração de celulose interfere mais no processo que a concentração de enzimas, apresentado na Tabela 5, efeito 1L by 2L.

Figura 8 – Superfície de resposta concentração inicial de celulose (C_0) x concentração inicial de enzima (e_0) x concentração de etanol em g/l.

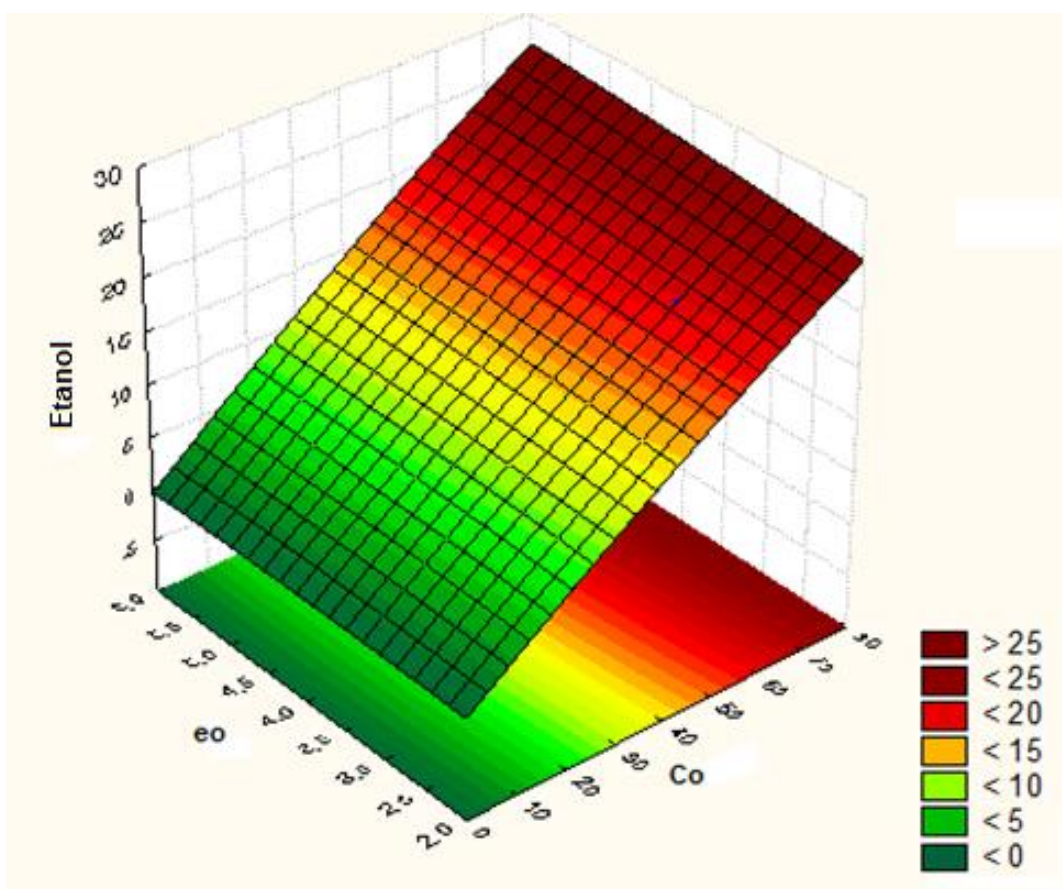
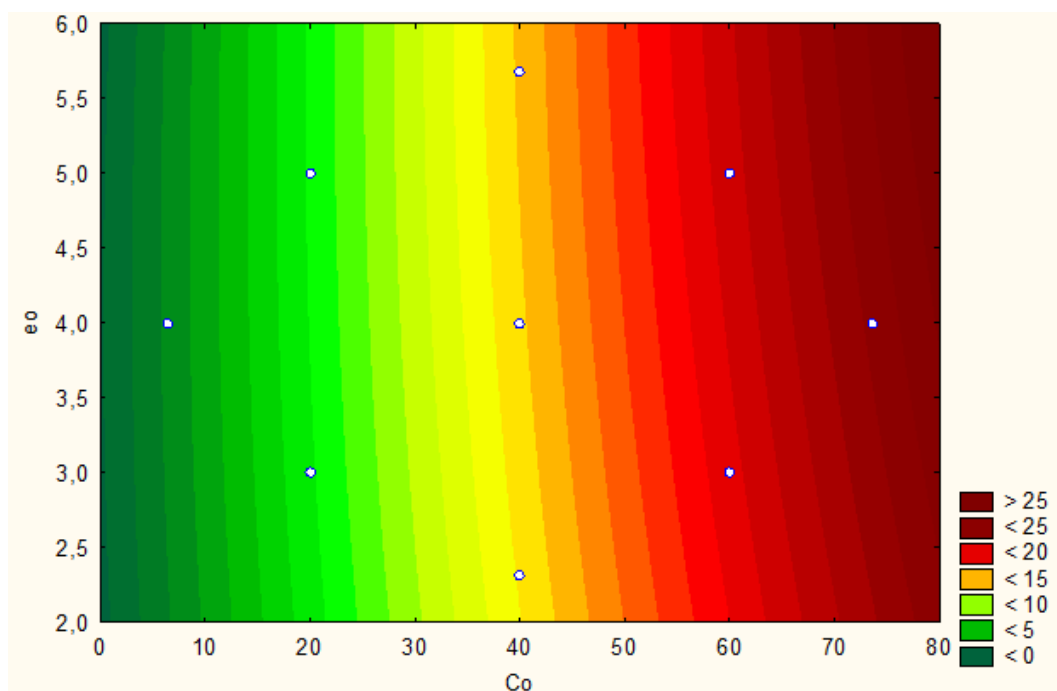
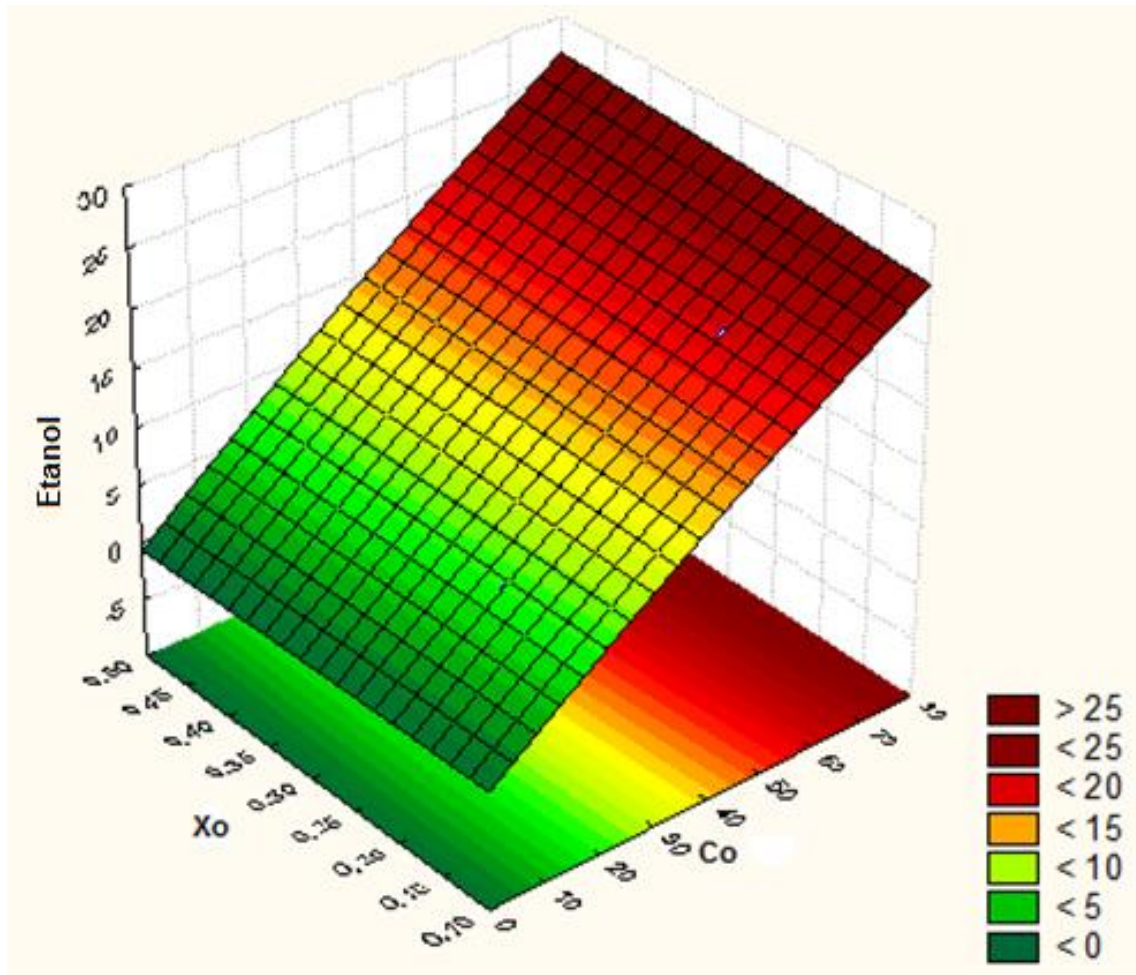


Figura 9 – Superfície de contorno representando a produção de etanol (legenda em g/l), a partir das concentrações iniciais de enzima (e_0) e de celulose (C_0) em g/l.



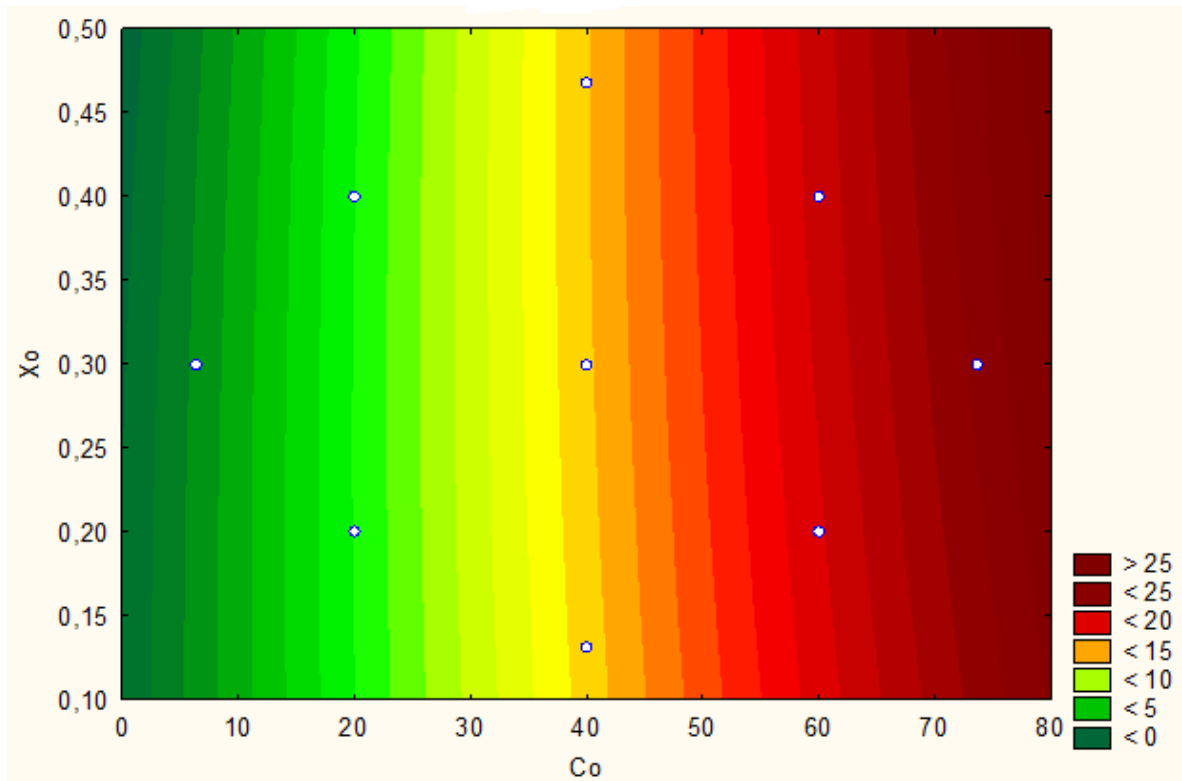
A Figura 10 apresenta maiores concentrações de etanol para maiores concentrações iniciais de celulose e maiores concentrações iniciais de células.

Figura 10 – Superfície de resposta concentração inicial de celulose (C_0) x concentração inicial de células (e_0) x concentração de etanol em g/l.



Observando-se a Figura 11, pode-se notar que maiores concentrações iniciais de celulose e de células propiciam uma maior concentração de etanol, no entanto, o efeito da concentração inicial de celulose é muito maior que o efeito da concentração inicial de células. Assim a interação entre as duas variáveis é pequena, conforme apresentado na Tabela 4, no efeito 1L by 3L.

Figura 11 – Superfície de contorno representando a produção de etanol (legenda em g/l) a partir das concentrações iniciais de células (X_0) e de celulose (C_0) em g/l.



Finalizando a análise das interações das variáveis, na Figura 12, os maiores concentrações de etanol de segunda geração não são tão afetados pelo aumento das concentrações iniciais de enzima (e_0) e concentrações iniciais de células (X_0), se a concentração de substrato é constante. A parte mais escura da superfície, que representa as maiores concentrações de etanol, é obtida a partir de concentrações iniciais de enzima superiores a 3,0 g/l e concentrações iniciais de células superiores a 0,3 g/l.

Esse efeito é mais facilmente notado na Figura 13. Apenas uma pequena área da superfície de contorno, representada por menores concentrações iniciais de enzimas e células, produzem etanol a uma concentração inferior a 13 g/l. Assim, as variáveis e_0 e X_0 quase não possuem interação entre si, conforme Tabela 5, na qual é apresentado que 2L by 3L é igual a -0,04083, diferentemente das interações 1L by 2L e 1L by 3L cujos resultados foram iguais a aproximadamente 0,31.

Figura 12 – Superfície de resposta concentração inicial de enzimas (e_0) x concentração inicial de células (X_0) x concentração de etanol em g/l.

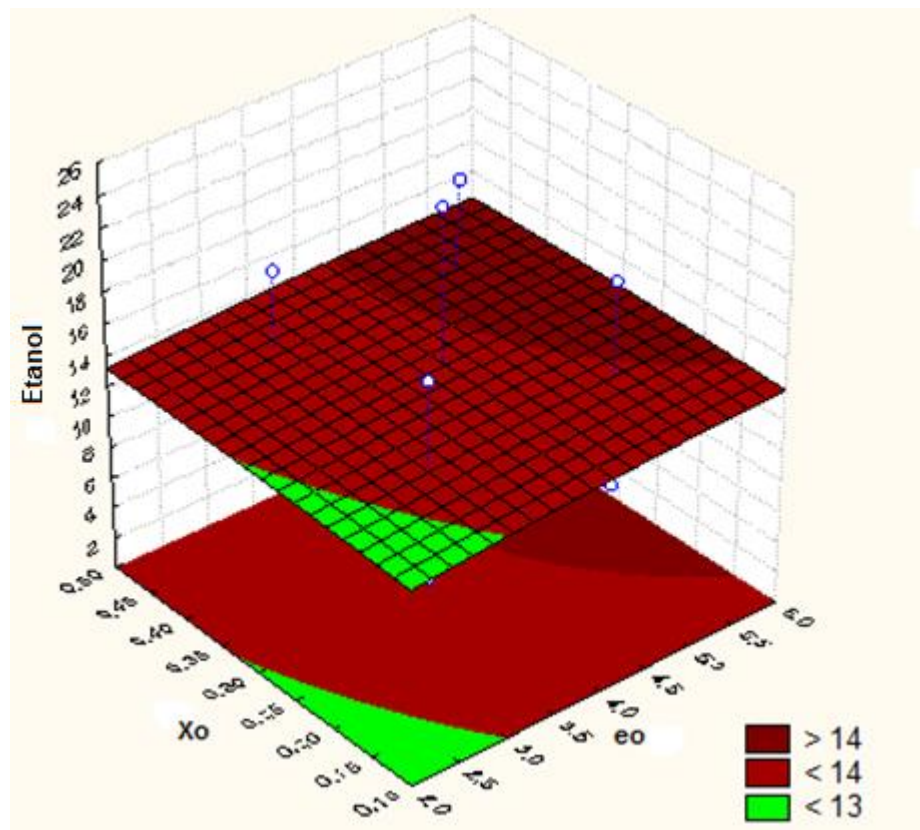
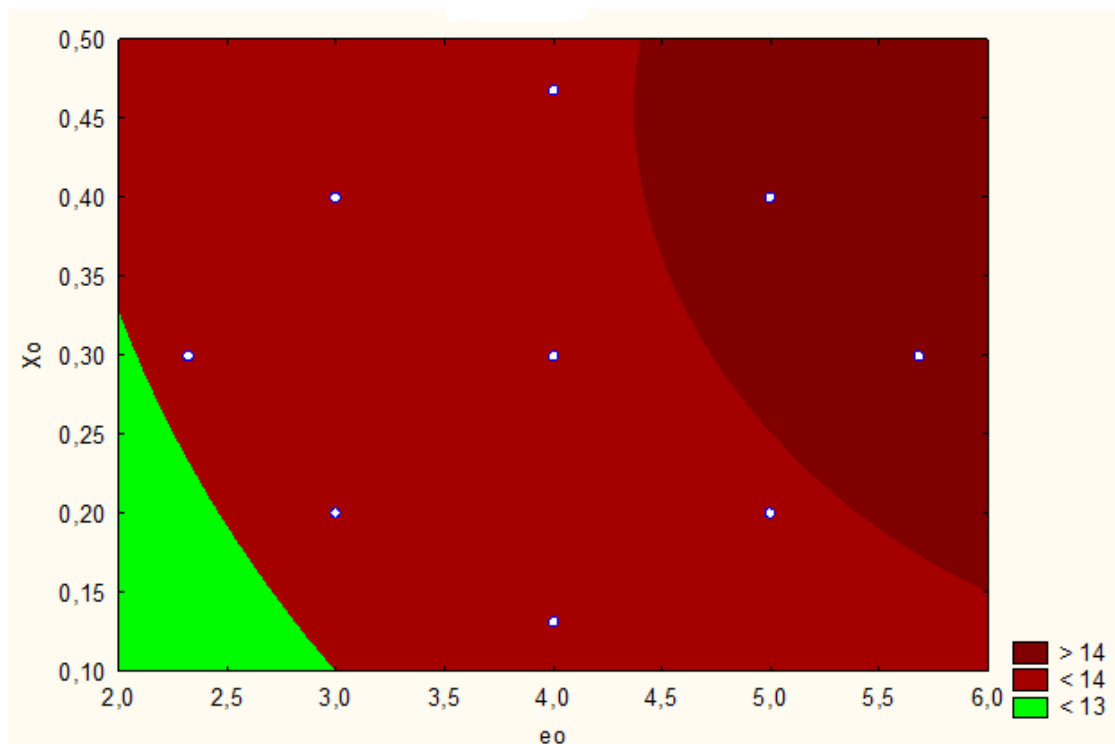


Figura 13 – Superfície de contorno representando a produção de etanol (legenda em g/l) a partir das concentrações iniciais de enzima (e_0) e células (X_0) em g/l.



A partir das superfícies de resposta e de contorno apresentadas nas Figuras 8 a 13, fica mais claro perceber que a concentração inicial de celulose é a variável que mais influencia no processo SSF de produção de etanol de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica em reator batelada. Na Figura 13, a região de maior concentração de etanol é obtida com concentrações iniciais de enzima e células de aproximadamente 5,58 e 0,468, respectivamente, representado pelos máximos estudados na Tabela 4.

6.3 SIMULAÇÃO DO PROCESSO SSF EM REATOR CONTÍNUO

Visando melhorar a concentração de etanol no processo, os valores apresentados como ótimos pelo Delineamento Composto Central Rotacional, que foram 5,58 g/l para enzimas e 0,468 g/l para células, foram testados no simulador SSF em reator contínuo, variando a concentração inicial de celulose, a fim de se constatar se essa variável também tem maior efeito em reator contínuo. Os dados de entrada são C_1 , C_0 , e_0 , X_0 , D e t , respectivamente, concentração inicial de celulose no fluxo de alimentação, concentração inicial de celulose na cultura, concentração inicial de enzima, concentração inicial de células, taxa de diluição e tempo, as variáveis de saída são concentrações de celobiose, glicose, células, etanol e enzimas, assim como o gráfico das variações dessas concentrações com o tempo.

O tempo de processo foi fixado em 48h, pois é aproximadamente o tempo no qual a concentração de etanol atinge o máximo em reator batelada.

A primeira simulação em processo contínuo utilizou concentrações iguais de celulose no fluxo de alimentação e na cultura inicial do reator contínuo de 20 g/l, concentração de enzima de 5,58 g/l, concentração de células de 0,468 g/l, taxa de diluição de $0,01 \text{ h}^{-1}$ e tempo de 48h. As concentrações de celobiose, glicose, células, etanol e enzimas no final deste tempo foram 0,3297; 0,1820; 1,6642; 8,0717 e 0,7005 g/l respectivamente, conforme apresentado na Figura 14.

Figura 14 – Gráfico do processo SSF em reator contínuo nas condições iniciais de celulose na cultura, celulose no fluxo de alimentação, de enzima, células iguais a 20 g/l, 20 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l, taxa de diluição de $0,01 \text{ h}^{-1}$ e tempo de 48h.

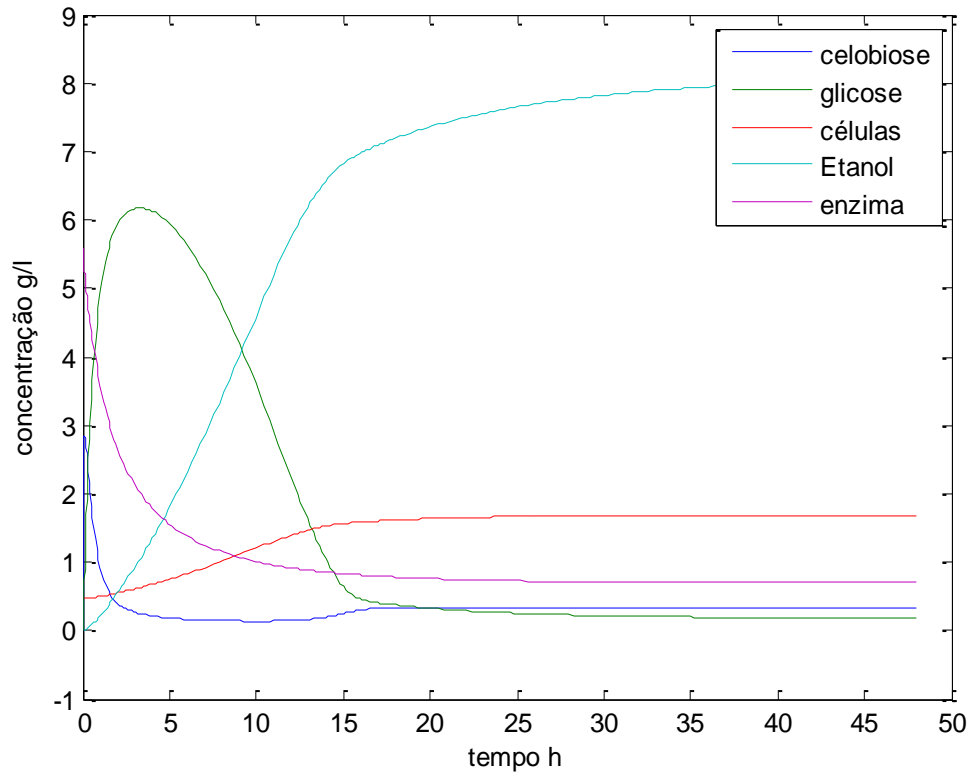
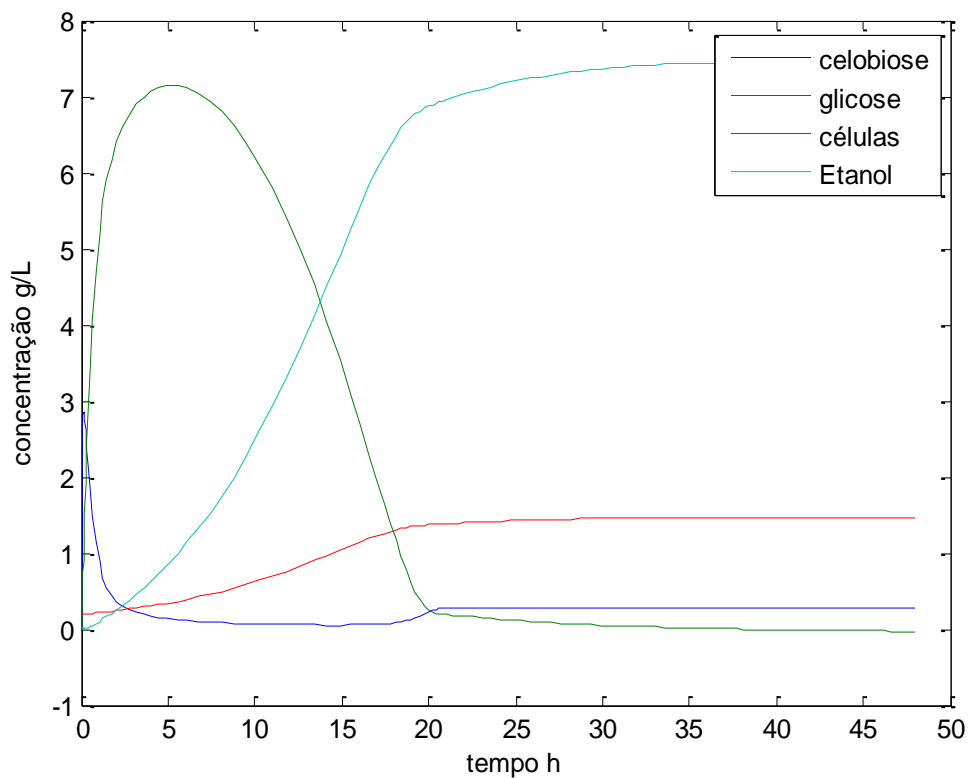


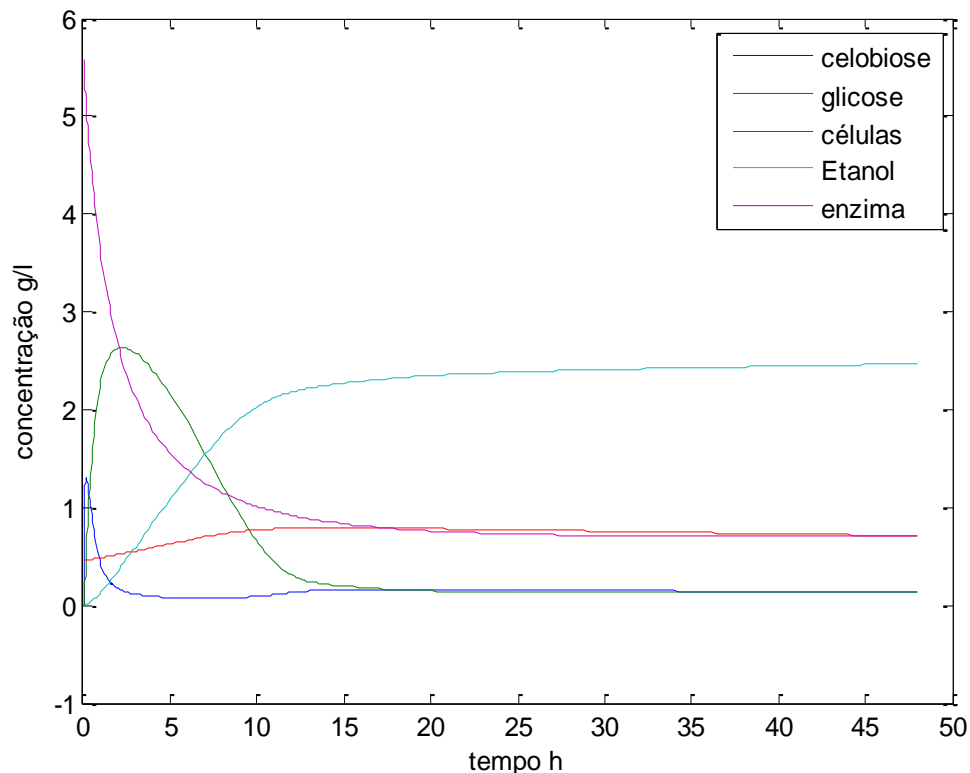
Figura 15 – Gráfico do processo SSF em reator batelada nas condições iniciais de celulose, de enzima, células iguais a 20 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l e tempo de 48h.



Comparando a simulação em reator contínuo apresentada na Figura 14 com a simulação nas mesmas concentrações iniciais em reator batelada, obtém-se que as concentrações de celobiose, glicose, células e etanol no final de 48 h foram 0,2748; 0; 1,4550 e 7,3692 g/l respectivamente, conforme apresentado na Figura 15. A produção de etanol no reator contínuo foi um pouco maior que a produção em reator batelada, sendo 8,0717 g/l e 7,3692 g/l, nessa ordem.

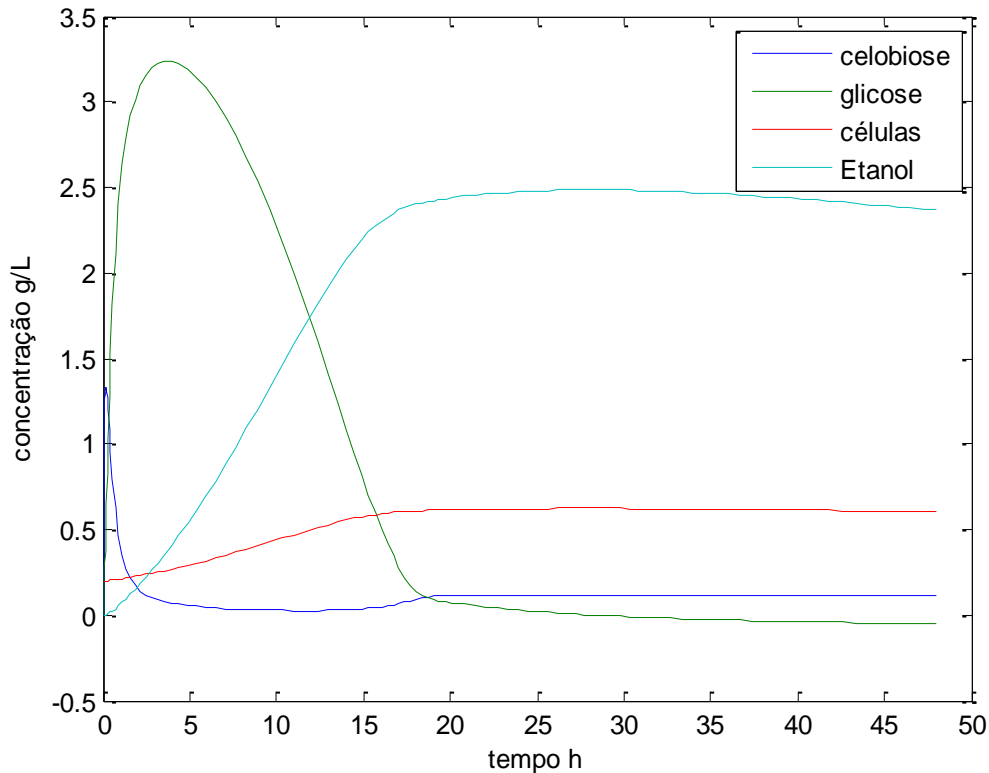
Como já descrito anteriormente, a variável concentração de celulose interfere no processo batelada, utilizou-se o valor mínimo testado no DCCR para nova simulação. Os novos valores testados foram: concentrações iguais de celulose no fluxo de alimentação e na cultura inicial do reator contínuo de 6,4 g/l, concentração de enzima de 5,58 g/l, concentração de células de 0,468 g/l, taxa de diluição de $0,01 \text{ h}^{-1}$ e tempo de 48h. As concentrações de saída foram: celobiose – 0,1396 g/l, glicose – 0,1328 g/l, células – 0,7100 g/l, etanol – 2,4684 g/l e enzimas – 0,7005 g/l, apresentados variando com o tempo, conforme Figura 16.

Figura 16 – Gráfico do processo SSF em reator contínuo nas condições iniciais de celulose na cultura, celulose no fluxo de alimentação, de enzima, células iguais a 6,4 g/l, 6,4g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l, taxa de diluição de $0,01 \text{ h}^{-1}$ e tempo de 48h.



A concentração do etanol foi inferior, diminuindo-se a concentração inicial de celulose. As mesmas condições iniciais foram inseridas no simulador para reator batelada, cujos dados foram apresentados na Figura 17.

Figura 17 – Gráfico do processo SSF em reator batelada nas condições iniciais de celulose, de enzima, células iguais a 6,4 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l e tempo de 48h.



As concentrações finais de celobiose, glicose, células e etanol para as condições da Figura 17 em reator batelada foram, respectivamente, 0,1133; 0; 0,6029 e 2,3658 g/l. A diferença entre as concentrações de etanol nos dois reatores foi insignificante para a concentração inicial de celulose igual a 8,4 g/l.

Diminuindo-se as concentrações de alimentação de celulose, a produção de etanol também diminuiu, de acordo com as Figuras 14 e 16. Fez-se então novas simulações, não alterando as concentrações de enzima e células, nem taxa de diluição e tempo.

Nesta nova simulação, as concentrações iniciais utilizadas foram:

- ✓ Celulose na corrente de alimentação – 40 g/l
- ✓ Celulose na cultura inicial do reator – 40 g/l

Obteve-se seguintes concentrações de saída:

Celobiose – 0,6079 g/l

Glicose – 0,2096 g/l

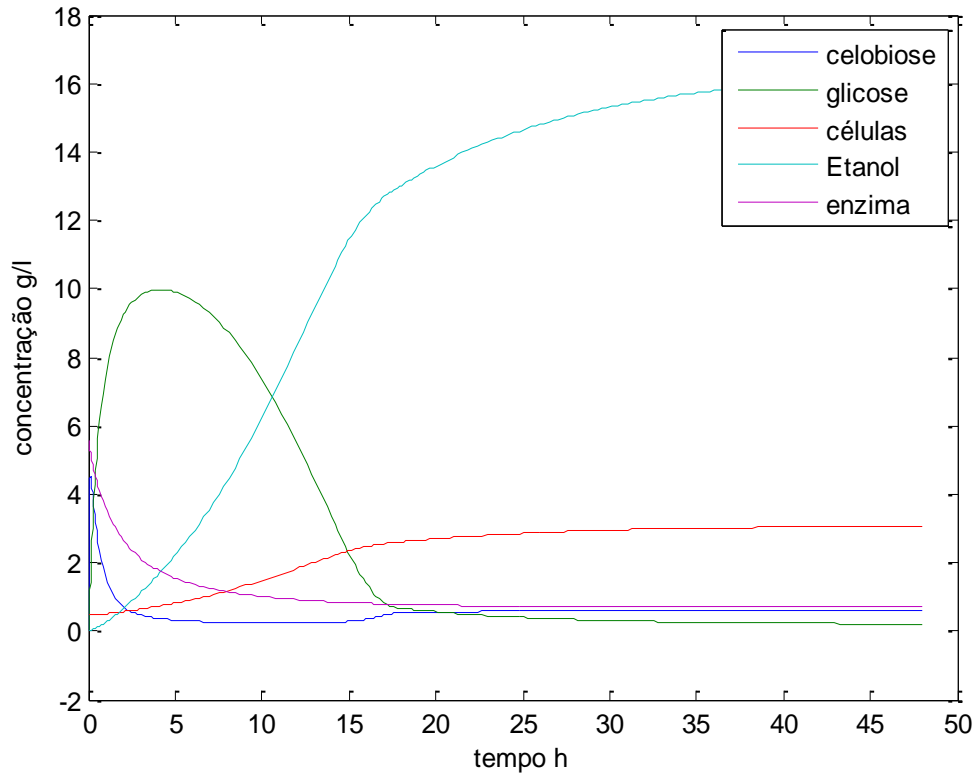
Células – 3,0554 g/l

Etanol – 16,2406 g/l

Enzima – 0,7005 g/l

A Figura 18 representa a variação dessas variáveis para as condições iniciais citadas.

Figura 18 – Gráfico do processo SSF em reator contínuo nas condições iniciais de celulose na cultura, celulose no fluxo de alimentação, de enzima, células iguais a 40,0 g/l, 40,0 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l, taxa de diluição de $0,01 \text{ h}^{-1}$ e tempo de 48h.



Com o aumento das concentrações de celulose, nota-se um aumento na produção de etanol.

A simulação em reator batelada com concentração inicial de celulose de 40 g/l, apresentada na Figura 19, produziu os resultados:

Celobiose – 0,4966 g/l

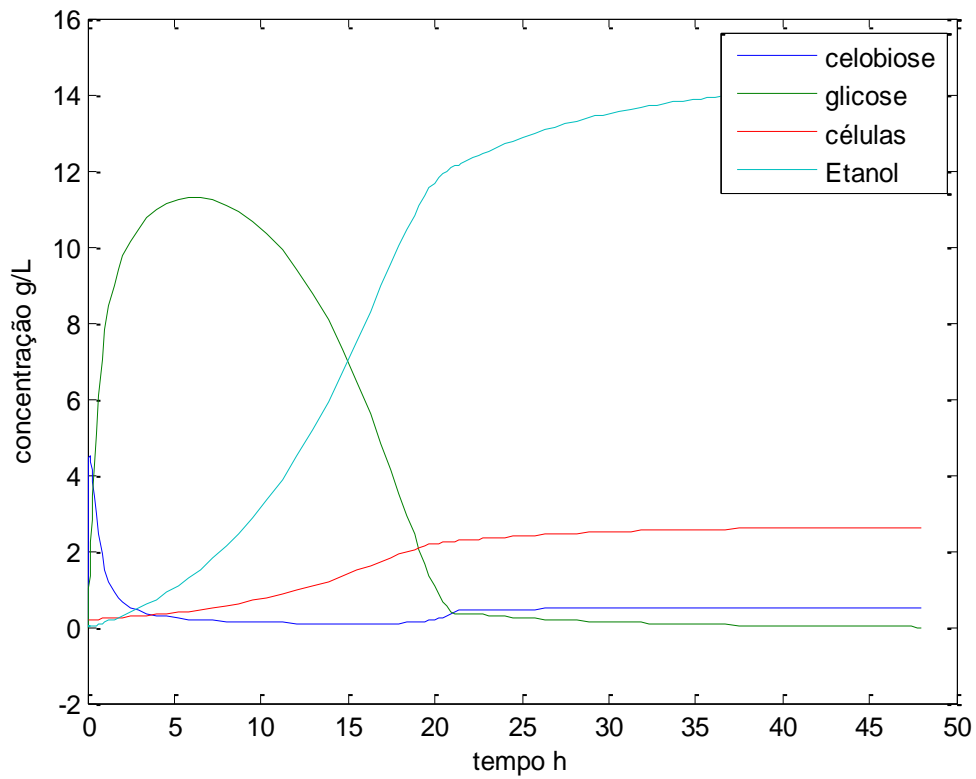
Glicose – 0 g/l

Células – 2,6132 g/l

Etanol – 14,1701 g/l

Com concentrações iniciais de celulose de 40 g/l a produção de etanol em reator contínuo (16,2406 g/l) foi superior à produção em reator batelada (14,1701 g/l).

Figura 19 – Gráfico do processo SSF em reator batelada nas condições iniciais de celulose, de enzima, células iguais a 40 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l e tempo de 48h.



Simulou-se por fim, em reator contínuo, a concentração inicial na cultura do reator de 60 g/l e variou-se as concentrações de celulose no fluxo de alimentação em 20 g/l, 40 g/l e 60 g/l. As Figuras 20, 21 e 22 apresentam as variáveis de saída celobiose, glicose, células etanol e enzimas para cada situação, que podem ser comparadas pela Tabela 6.

Tabela 6 – Variáveis de saída para simulação do processo SSF em reator batelada com concentrações iniciais de celulose na cultura, enzimas e células de 60 g/l, 5,58 g/l e 0.468 g/l, variando-se as concentrações iniciais de celulose no fluxo de alimentação.

Concentrações na saída (g/l)	$C_1 = 20$ g/l	$C_1 = 40$ g/l	$C_1 = 60$ g/l
Celobiose	0,8398	0,8620	0,8841
Glicose	0,2691	0,2477	0,2284
Células	4,1786	4,3093	4,4295
Etanol	22,8356	23,6034	24,3088
Enzimas	0,7005	0,7005	0,7005

Figura 20 – Gráfico do processo SSF em reator contínuo nas condições iniciais de celulose na cultura, celulose no fluxo de alimentação, de enzima, células iguais a 60,0 g/l, 20,0 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l, taxa de diluição de 0,01 h⁻¹ e tempo de 48h.

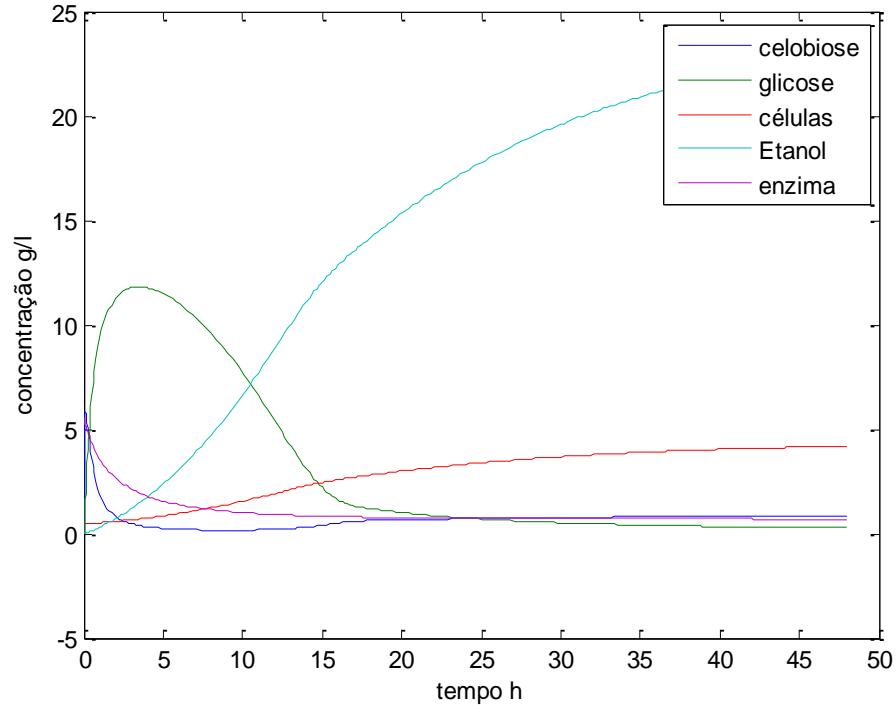


Figura 21 – Gráfico do processo SSF em reator contínuo nas condições iniciais de celulose na cultura, celulose no fluxo de alimentação, de enzima, células iguais a 60,0 g/l, 40,0 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l, taxa de diluição de 0,01 h⁻¹ e tempo de 48h.

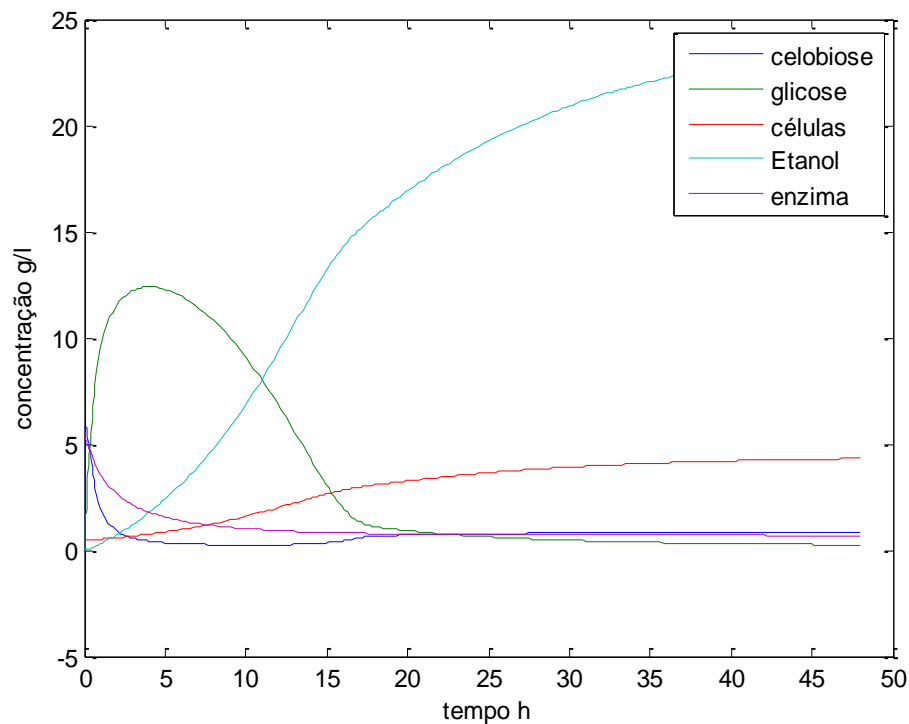
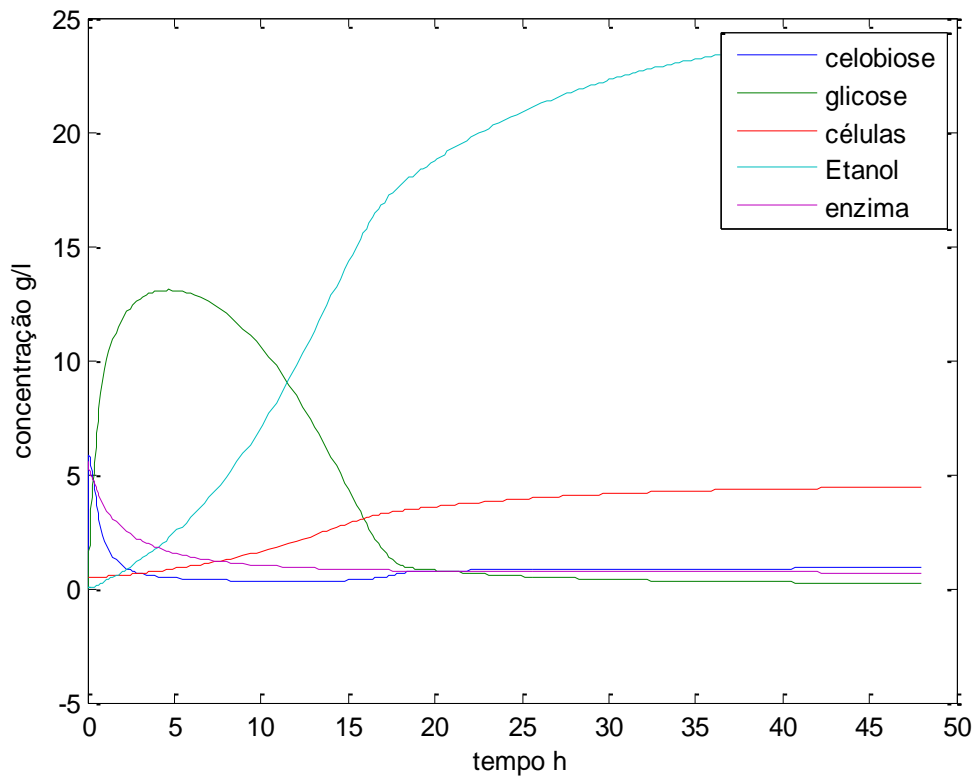


Figura 22 – Gráfico do processo SSF em reator contínuo nas condições iniciais de celulose na cultura, celulose no fluxo de alimentação, de enzima, células iguais a 60,0 g/l, 60,0 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l, taxa de diluição de 0,01 h⁻¹ e tempo de 48h.



Aumentando-se, na simulação em reator contínuo, a concentração de celulose na cultura para 60 g/l, a concentração de etanol também aumentou. A concentração de celulose inicial no fluxo de alimentação não alterou significativamente a concentração do produto, segundo a Tabela 6.

Comparou-se a produção de etanol com concentração inicial de celulose de 60 g/l em reator contínuo e batelada, cuja simulação deste último reator está presente na Figura 23. Os valores das concentrações de saída em reator batelada para a concentração inicial de celulose apresentada foram:

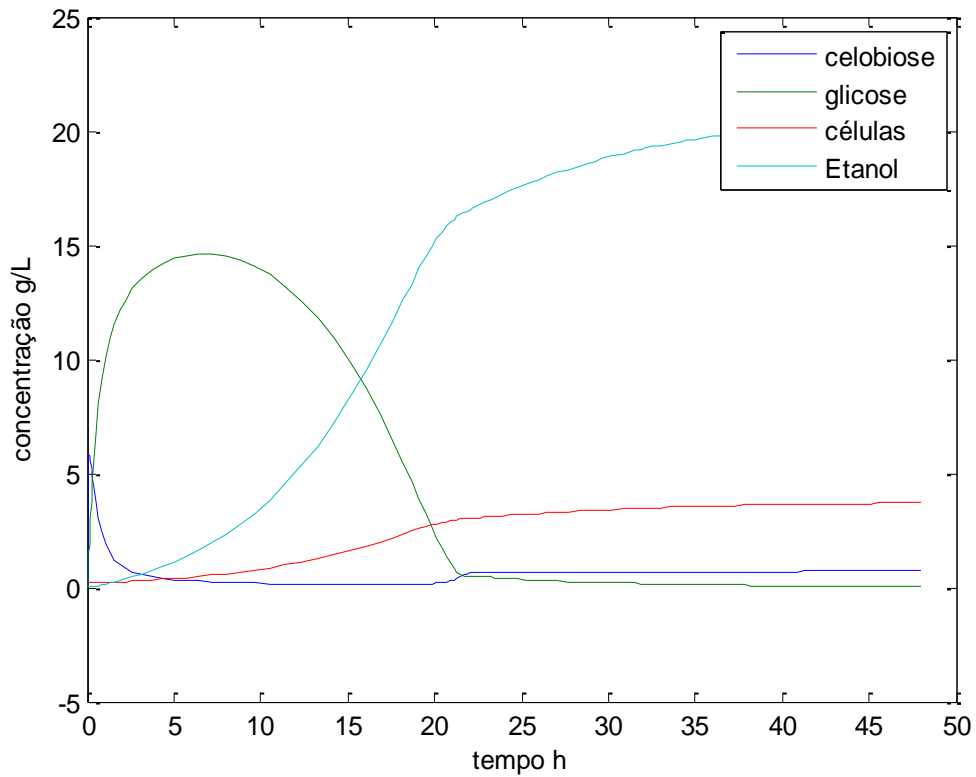
Celobiose - 0,7061 g/l

Glicose - 0,0209 g/l

Células - 3,6972 g/l

Etanol - 20,5351g/l

Figura 23 – Gráfico do processo SSF em reator batelada nas condições iniciais de celulose, de enzima, células iguais a 60 g/l, 5,58 g/l, 0,468 g/l e tempo de 48h.



Para a concentração inicial de celulose de 60 g/l, a produção de etanol de segunda geração pelo processo SSF foi maior em reator contínuo, utilizando-se concentrações no fluxo de alimentação de 20 g/l, 40 g/l ou 60 g/l, em comparação com o reator batelada nas mesmas condições.

7 CONCLUSÕES

Os softwares desenvolvidos neste trabalho, para simulação do processo de sacarificação e fermentação simultâneas da biomassa lignocelulósica para produção de etanol de segunda geração, têm sua importância na verificação das condições ótimas para a produção deste tipo de etanol, seja em reator batelada como em reator contínuo.

Utilizando-se biomassa pré-tratada, podem-se variar as condições iniciais do processo (concentração de celulose, enzimas, células e tempo de processo) minimizando os custos e tempo de simulação em laboratório, para que o processo possa ser feito em maior escala.

Através das simulações efetuadas em reator batelada, após o Delineamento Composto Central Rotacional, concluiu-se que as variáveis que interferem no processo são primeiramente a concentração de celulose, seguida pela concentração de enzimas e por fim da concentração de células (inóculo de levedura). Assim, quanto maiores as concentrações de celulose (60 g/l) e maiores concentrações de células e enzimas (0,458 g/l e 5,58 g/l, respectivamente), maior rendimento de etanol de segunda geração em reator batelada.

Para não limitar a simulação apenas ao reator batelada, mesmo já se tenha obtido uma otimização das condições iniciais do processo SSF de biomassa lignocelulósica, fez-se a simulação em reator contínuo. Neste reator, há necessidade de uma cultura inicial, pois o tempo de hidrólise é maior que o tempo de fermentação, assim, além da concentração de celulose na corrente de alimentação, tem-se a concentração de celulose na cultura inicial do reator. Analisando as simulações efetuadas no software elaborado para o processo SSF de biomassa lignocelulósica em reator contínuo para produção de etanol de segunda geração, pode-se concluir que a concentração de celulose na cultura inicial do reator e na corrente de alimentação interferem na produção do etanol, assim, quanto maior a concentração de celulose empregada em reator contínuo, maior a produção de etanol.

Dessa forma, os softwares podem ser utilizados para minimizar custos do processo, seja pela redução de matéria-prima, seja pela diminuição de custos de operação, a fim de contribuir para que o etanol de segunda geração se torne uma fonte viável de combustível para nosso país.

8 REFERÊNCIAS

- AGBOR, Valery et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, Manitoba, Canada, v. 29, p. 675–685, 2011.
- BAILEY, James E.; OLLIS, David F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2. ed. United States: McGraw-Hill, 1986. 984 p.
- BALAT, Mustafa; BALAT, Havva; Öz, Cahide. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, Trabzon, Turkey, v. 34, p. 551-573, 2008.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Culturas: cana-de-açúcar**, Brasília, 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 6 jun 2013.
- BRETHAUER, Simone; WYMAN, Charles E.. Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, Riverside, USA, v. 101, p.4862-4874, 2010.
- BRODEUR, Gary et al. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Enzyme Research**, Tallahassee, p. 1-17, 2011.
- CALADO, Verônica; MONTGOMERY, Douglas C.. **Planejamento de Experimentos usando Statística**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2003. 260 p.
- CAMPOS FILHO, Frederico Ferreira. Equações diferenciais ordinárias. In: _____. **Algoritmos Numéricos**. 2. ed. Belo Horizonte: LTC, 2007. Cap. 7, p. 3281-334.
- CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C.. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, Monizales, Colombia, v. 101, p.4754-4766, 2010.
- CHIARAMONTI, David et al. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production and development of an innovative method. **Biomass and Bioenergy**, Florence, v. 46, p. 25-35, 2012.
- CORTEZ, Luís Augusto Barbosa; LORA, Electo Eduardo Silva; GÓMEZ, Edgardo Olivares (org). **Biomassa para energia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2008, p. 15 – 29.
- DIAS, Marina O. S. et al. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? **Bioresource Technology**, Campinas, Brazil, n. 102, p.8964-8971, 13 jul. 2011.
- DIAS, Marina O. S. et al. Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. **Energy**, Campinas, SP, Brazil, v. 43, p.246-253, 2012.
- DOGARIS, I.; MAMMA, D.; KEKOS, D. Biotechnological production of ethanol from renewable resources by *Neuspora crassa*: an alternative to conventional yeast fermentations? **Applied Microbiology and Biotechnology**. Athens, Greece, v. 97, 2013, p. 1457-1473.
- DUTTA, Rajiv. **Fundamentals of Biochemical Engineering**. New Delhi, India: Springer, 2008. Cap. 4, p. 70-91.

ELUMALAI, Sasikumar; THANGAVELU, Viruthagiri. Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of pretreated sugarcane bagasse using cellulase and *Saccharomyces cerevisiae* - Kinetics and modeling. **Chemical Engineering Research Bulletin**, Annamalai Nagar, India, v. 14, p.29-35, 2010.

ROSILLO-CALLE, Frank et al (Org.). **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas, Sp: Editora da Unicamp, 2005. Cap. 9, p. 339-396.

FOGLER, H. S. Elementos de engenharia das reações químicas. In: _____. **Leis de velocidade e estequiometria**. 4. ed. Michigan: LTC, 2012. cap. 3, p. 62–113.

GARCIA, Claudio. **Modelagem e simulação de processos industriais e de sistemas eletromecânicos**. 2. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2005. 680 p.

GILAT, Amos. **Matlab com aplicações em engenharia**. Tradução Glayson Eduardo de Figueiredo - 2 ed. - Porto Alegre: Bookman, 2006. 360 p.

GOÉS, Tarcizio. A energia que vem da cana-de-açúcar. **EMBRAPA**. 2008. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2008/A%20energia%20que%20vem%20da%20cana%20de%20acucar%20ultimo.pdf>>. Acesso em: 6 mar. 2012.

IDI, Ahmad; MOHAMAD, Shaza Eva. BIOETHANOL FROM SECOND GENERATION FEEDSTOCK (Lignocellulose biomass). **Interdisciplinary Journal Of contemporary research In Business**, Skudai Johor, Malasia, v. 3, n. 8, p.919-935, 2011.

JOSHI, Bishnu et al. Lignocellulosic ethanol production: Current practices. **Biotechnology And Molecular Biology Review**, Kirtipur, Nepal, v. 8, n. 6, p.172-182, nov. 2011.

KOSARIC, N.; VADAR-SUKAN, F.. Potential source of energy and chemical products: Substrates for industrial alcohol production. In: ROEHR, M. (Comp.). **The Biotechnology of ethanol: Classical and future applications**. Weinheim, Germany: Wiley-vch, 2001. Parte II. Cap. 4, p. 125-139.

KUMAR, Parveen et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for eficiente hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Davis, California. v. 48, p. 3713-3729, 2009.

LJUNGGREN, M.; WALLBERG, O.; ZACCHI, G.. Techno-economic comparison of a biological hydrogen process and a 2nd generation ethanol process using barley straw as feedstock. **Bioresource Technology**, Lund, Sweden, v. 102, p.9524-9531, 2011.

MENEGUELLO, Luiz Augusto; CASTRO, Marcus Cesar Avezum Alves. O Protocolo de Kyoto e a geração de energia elétrica pela biomassa da cana-de-açúcar como mecanismo de desenvolvimento limpo. **INTERAÇÕES**, Revista Internacional de Desenvolvimento Local, v. 8, n. 1, p. 33-43, Mar. 2007.

MUSSATTO, Solange I. et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, Braga, Portugal, v. 28, p.817-830, 2010.

OGEDA, Thais Lucy; PETRI, Denise F. S.. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA. **Quimica Nova**, São Paulo, Brasil, v. 33, n. 7, p.1549-1558, 2010.

OLOFSSON, Kim; BERTILSSON, Magnus; LIDÉN, Gunnar. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology For Biofuels**, Lund, Sweden, v. 7, n. 1, p.1-14, 2008.

PHILIPPIDIS, George P.; SMITH, Tammy K.; WYMAN, Charles E.. Cellulose for Production of Fuel Ethanol by the Simultaneous Saccharification and Fermentation Process. **Biotechnology And Bioengineering**, Golden, Colorado, Usa, v. 41, p.846-853, 1993.

RODRIGUES, Maria Isabel; IEMMA, Antonio Francisco. **Planejamento de Experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005. 326 p.

SANTOS, Fernando A. et al. POTENCIAL DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL. **Química Nova**, Viçosa, Brasil, v. 35, n. 5, p.1004-1010, 2012.

SANTOS, Julliana Ribeiro Alves Dos et al. COMPARAÇÃO ENTRE PROCESSOS EM SHF E EM SSF DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, Recife, Brasil, v. 33, n. 4, p.904-908, 2010.

SHEN, Jiacheng; AGBLEVOR, Foster A.. The operable modeling of simultaneous saccharification and fermentation of ethanol production from cellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Riverside, USA, v. 160, p. 665-681, 2010.

SILVA, Maria Das Graças Enrique da; SILVA JÚNIOR, João Lameu da; PINTO JÚNIOR, César Roberto Teixeira. Produção de Etanol de Segunda Geração: Uma Revisão. **Pensamento Plural: Revista Científica da UNIFAE**, São João da Boa Vista, v. 4, n. 2, p.59-71, 2010.

TAHERZADEH, Mohammad J.; KARIMI, Keikhosro. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, Sweden, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Blacksburg, USA, v. 35, p. 367-375, 2008.

ZHAO, Xuebing; CHENG, Keke; LIU, Dehua. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Beijing, China, v. 82, p. 815-827, 2009.