



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS



CENTRO DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LÍVIA LUÍSA MELO DE CARVALHO

**ESTUDO DA HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DOS RESÍDUOS DE MILHO (*Zea mays*)
PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

**Maceió
2016**

LÍVIA LUÍSA MELO DE CARVALHO

**ESTUDO DA HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DE RESÍDUOS DE MILHO (*Zea mays*)
PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Maria Rosas Garcia Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Wagner Roberto de Oliveira Pimentel

Maceió

2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Bibliotecária Responsável: Janaína Xisto

C331e Carvalho, Lívia Luísa Melo de.
Estudo da hidrólise e fermentação de resíduos de milho (Zea mays) para produção de etanol de segunda geração / Lívia Luísa Melo de Carvalho. – 2016.
67 f. : il.

Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.
Coorientador: Wagner Roberto de Oliveira Pimentel .
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 58-65.
Apêndice: f. 66-67.

1. Etanol. 2. Lignocelulósico – Pré-tratamento. 3. Bioetanol. I. Título.

CDU: 661.722

Livia Luisa Melo de Carvalho

**ESTUDO DA HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DOS RESÍDUOS DE
MILHO (ZEA MAYS) PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE
SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: Maceió, 04 de Abril de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Dr^a. Renata Maria Rosas Garcia Almeida (PPGEQ/UFAL – Orientadora)



Prof. Dr. Wagner Roberto Pimentel (CTEC/UFAL - Coorientador)



Prof. Dr. Antônio Osimar Sousa da Silva (PPGEQ/UFAL)



Prof^a. Dr^a. Valéria Rodrigues dos Santos Malta (Avaliadora Externa/IQ/UFAL)

À minha pequena Luísa, amor incondicional.

Aos meus amáveis pais, Edneide e Luiz, minha
fortaleza, meu tudo.

Ao meu querido irmão Sérgio, que vibra comigo a cada
conquista alcançada.

Aos meus sobrinhos, Alice, Luís Felipe e Letícia.

Ao meu esposo, Vinícius, que sempre me incentiva.

Aos meus familiares que torcem por mim.

AGRADECIMENTOS

À minha professora e orientadora, Renata Almeida, pela orientação na construção deste trabalho;

Aos professores do curso de Mestrado de Engenharia Química da UFAL, em especial ao meu co-orientador e que também foi orientador na minha graduação, Wagner Roberto, pelos ensinamentos durante essas duas etapas de minha formação acadêmica;

À professora que participou da minha banca na Qualificação do Mestrado, Karina Salomon, pela contribuição de conhecimento e sugestões;

Aos professores da banca de defesa, Osimar Souza e Valéria Malta pela disposição em avaliar este trabalho;

Ao meu professor Supervisor de Estágio Docência, Edmundo Accioly, pela oportunidade e orientação acadêmica;

Aos meus colegas de curso, que estiveram comigo durante esta caminhada;

Aos colegas do laboratório LTBA, Carlos Eduardo, Ítalo, José Henrique, Jumelice, Kledson, Márcia, em especial à Margarete Cabral pelos esclarecimentos nos experimentos e amizade;

Ao grupo Maranhão (Usina Santo Antônio) meu eterno agradecimento, em especial a Dr^a Renata Maranhão e Dr. Luiz Ernesto Maranhão (*in memoriam*) pela oportunidade e confiança. Também aos amigos e ex-colegas de trabalho, Francisco e Iorranes pela amizade e apoio às análises;

Aos colegas de trabalho professores do IFAL, Cecília, Jonas e Jonnathan e os alunos Pablo e Cristian pela contribuição nas análises;

À CAPES, pelo apoio financeiro.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível”.

(Chales Charplin)

RESUMO

No contexto atual da procura por bioprodutos a partir de fontes renováveis e a preocupação com as condições ambientais torna os biocombustíveis, que são produzidos a partir de biomassa, uma alternativa à dependência mundial por produtos derivados de petróleo. Desta forma, há uma crescente valorização de resíduos provenientes da agroindústria como fonte de matéria-prima lignocelulósica para obtenção de etanol 2G (etanol de segunda geração). Neste sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar as etapas de hidrólise e fermentação do caldo hidrolítico da palha e do sabugo de milho para produção de etanol de segunda geração, testando diferentes condições de processo. Para tanto, foram utilizados resíduos de milho pré-tratados com H_2SO_4 0,5% a 121°C por 15 minutos em ensaios de hidrólise enzimática em mesa incubadora rotativa tipo *shaker* à 50°C e 150rpm, utilizando 20FPU/mL de enzima *Cellic Ctec 2*[®], variando a carga de biomassa, tempo de hidrólise e tipo de biomassa de acordo com o planejamento experimental, o qual viabilizou o estudo das melhores condições de operação da hidrólise, através da observação dos efeitos e combinações dos parâmetros, onde o melhor índice de ART (g/L) foi para a palha com 5 g de biomassa por 48 horas obtendo 30,68g/L, na faixa investigada. A fermentação foi conduzida em *shaker* à 30°C, 200rpm por 24hs com eficiência de fermentação de 90,97%, obtendo-se 3,9g/L de álcool.

Palavras-chave: Lignocelulósico. Pré-tratamento. Bioetanol.

ABSTRACT

In the current context of the demand for bioproducts from renewable sources and concern for environmental conditions makes biofuels, which are produced from biomass, an alternative to the global dependence on oil products. Thus, there is a growing appreciation of residues from the agricultural industry as a source of lignocellulosic raw material for the production of ethanol 2G (second generation ethanol). In this sense, the objective of this study was to evaluate the steps of hydrolysis and fermentation broth hydrolytic straw and corn cobs for second generation ethanol production, testing different process conditions. Therefore, pretreated corn stover were used with H₂SO₄ 0.5% at 121 ° C for 15 minutes in enzymatic hydrolysis tests rotary incubator shaker table type at 50 ° C and 150rpm, using 20FPU / mL enzyme Cellic Ctec 2[®], ranging biomass load, hydrolysis time and type of biomass according to the experimental design, which enabled study of the best hydrolysis operating conditions, by observing the effects and combinations of parameters, where the best ART index (g / L) was at the straw with 5 g biomass for 48 hours to give 30,68g / L in the investigated range. The fermentation was conducted at 30 ° C in a shaker, 200 rpm for 24h fermentation with 90.97% efficiency, yielding 3.9g / L of ethanol.

Keywords: Lignocellulosic. Pretreatment. Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Principais utilizações da cultura do milho.....	18
Figura 2- Localização da região de plantio e comercialização de milho 2015/16 no Brasil...	19
Figura 3- Fontes renováveis de energia	20
Figura 4- Estrutura dos materiais lignocelulósicos	22
Figura 5- Instalações industriais: refinaria convencional x biorrefinaria	25
Figura 6- Evolução dos biocombustíveis no Brasil	26
Figura 7- Etapas da produção de bioetanol de acordo com a matéria-prima	27
Figura 8- Representação esquemática da produção de etanol a partir de resíduos de milho ...	28
Figura 9- Efeito de diferentes pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos	30
Figura 10- Enzimas envolvidas na hidrólise da celulose	34
Figura 11- Fluxograma do processo de hidrólise e fermentação em separado	37
Figura 12- Fluxograma do procedimento analítico	38
Figura 13- Reação de redução do ácido dinitrossalicílico pelo açúcar redutor em meio alcalino a ácido 3-amino-5-nitrossacílico formando ácido aldônio	41
Figura 14- Curva do fator de DNS	42
Figura 15- Cromatograma de verificação e calibração GC.....	44
Figura 16- Gráfico de Pareto	49
Figura 17- Gráfico de probabilidade	50
Figura 18- Ajuste ao modelo linear	51
Figura 19- Superfície de resposta 3D.....	52
Figura 20- Curvas de nível da resposta ART (g/L)	52
Figura 21- Dados da fermentação e produção de etanol.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição química parcial de alguns materiais	23
Tabela 2- Empresas que utilizam os resíduos de milho para a produção de etanol celulósico no mundo	24
Tabela 3- Comparação dos parâmetros do processo e desempenho dos três processos de hidrólise da celulose	33
Tabela 4- Fermentação de hidrolisados a partir de organismos fermentadores de xilose nativos e recombinantes	35
Tabela 5- Efeitos e níveis escolhidos para a realização da hidrólise para as biomassas.....	40
Tabela 6- Teor de umidade da palha e do sabugo de milho <i>in natura</i>	45
Tabela 7- Rendimento mássico obtido após pré-tratamento	46
Tabela 8- Matriz de planejamento com duplicata para ambas as biomassas	47
Tabela 9- ANOVA para o modelo linear em ART	50
Tabela 10- Produção de álcool e formação de glicerol.....	54
Tabela 11- Padrão para álcool utilizando GC.....	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivo específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	A cultura do milho	17
3.1.1	A Utilização do milho e o aproveitamento da palha e do sabugo	17
3.1.2	O mercado do milho	18
3.2	Fontes renováveis de energia	19
3.2.1	Biomassa: fonte lignocelulósica	20
3.2.1.1	Composição lignocelulósica: celulose, hemicelulose e lignina	21
3.3	Biorrefinarias	24
3.4	Biocombustíveis: bioetanol	25
3.4.1	Etanol lignocelulósico (etanol 2G)	27
3.4.2	Bioetanol e o meio ambiente	28
3.5	Tecnologias de conversão	29
3.5.1	Pré-tratamento da biomassa	30
3.5.1.1	Pré-tratamentos físicos	31
3.5.1.2	Pré-tratamentos físicos-químicos	31
3.5.1.3	Pré-tratamentos biológicos	32
3.5.2	Hidrólise	32
3.5.2.1	Hidrólise ácida	33

3.5.2.2	Hidrólise enzimática	33
3.6	Fermentação	34
3.6.1	Microrganismo agente da fermentação	34
3.6.2	Processos fermentativos	36
3.6.2.1	Processo com configuração SHF (<i>Separated Hydrolysis and Fermentation</i>)	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Matéria-prima utilizada	39
4.2	Pré-tratamento ácido	39
4.3	Estudo da hidrólise enzimática dos pré-tratados dos resíduos de milho através da técnica de planejamento experimental	40
4.4	Estudo da fermentação do caldo hidrolítico dos resíduos de milho	42
4.4.1	Microrganismo empregado na fermentação	42
4.4.2	Preparo do inóculo e do meio de fermentação	43
4.4.3	Processo fermentação	43
4.4.3	Processo de destilação	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
5.1	Determinação da umidade dos resíduos de milho <i>in natura</i>	45
5.2	Rendimento mássico após pré-tratamento	45
5.3	Matriz de planejamento	46
5.3.1	Análise de variância do modelo estatístico	48
5.4	Fermentação e álcool produzido	53
5.5	Qualidade do álcool produzido	55

6	CONCLUSÕES	56
7	SUGESTÕES PARA ETAPAS FUTURAS	57
	REFERÊNCIAS	58
	APÊNDICE.....	66

1 INTRODUÇÃO

Durante anos os produtos de refino de petróleo tornaram-se a principal fonte de geração de energia e a principal base para o crescimento das indústrias químicas. Em suma, existe uma dependência mundial por esta matéria-prima de origem fóssil e não renovável. Nesse âmbito, os resíduos provenientes da agroindústria estão sendo cada vez mais explorados como fonte de biomassa, sobretudo como matéria-prima lignocelulósica, minimizando os problemas relacionados à disposição dos mesmos ao meio ambiente e proporcionando um novo destino para obter produtos de interesse industrial, tais como o etanol 2G (etanol de segunda geração).

A demanda por energia sustentável é classificada como uma das maiores preocupações no mundo. Devido ao aumento de consumo dos combustíveis convencionais (petróleo e gás natural), oscilação dos preços e o aumento dos efeitos da mudança climática, há uma necessidade urgente de promover o uso de fontes de energia renováveis para um futuro sustentável (NDIMBA et al., 2013). Alternativas que ofereçam flexibilidade e economia desses recursos vêm sendo procurados já há muitos anos (HINRICHS et al., 2010). Uma delas é o desenvolvimento de uma série de processos químicos novos com base em matérias-primas sustentáveis e verde, normalmente a biomassa (ZHOU et al., 2011). A reutilização de resíduos agrícolas (biomassa) provenientes de outros processos propicia o uso de insumos mais baratos, evita o acúmulo dessas biomassas no meio ambiente (CINELLI, 2012). Além disso, é uma alternativa que pode tornar o preço do bioetanol mais competitivo e proporcionar a ampliação de fontes de produção através de um material bem mais abundante do que os materiais utilizados para a primeira geração.

O bioetanol de segunda geração feito a partir de biomassa lignocelulósica, tais como resíduos de milho e de cana-de-açúcar etc, em contraste com o bioetanol de primeira geração que é derivado de açúcar e amido pode ser produzido a partir de qualquer matéria-prima de origem biológica que possua quantidades apreciáveis de açúcar ou de materiais que possam ser convertidos em açúcares fermentescíveis, tais como a celulose (PALACIO et al., 2012; SAINI et al., 2015). Uma grande parte desses materiais com alto teor de celulose é gerada como resíduo nos processos produtivos das indústrias. Adicionalmente, as tecnologias para a produção de etanol 2G podem triplicar a sua produção por hectare, e ao contrário das matérias-primas das tecnologias de primeira geração, não competem com a produção de alimentos (PERDICES et al., 2012).

A biomassa celulósica inclui restos de madeira, folhas, casca de arroz, gramíneas, resíduos agrícolas, como palha e sabugo de milho (RABELO et al., 2010). Porém, a biomassa mais popular no Brasil é, sem dúvida, o bagaço de cana-de-açúcar com grande potencial para a produção de etanol celulósico (CARLI, 2011). Até 2020, o país poderá começar a usar também o milho como matéria-prima para a produção de etanol (ANP, 2015).

Segundo Cinelli (2012), o Brasil é o país que mais possui vantagens para liderar a agricultura de energia, com o maior potencial de desenvolvimento na produção de energia renovável, como o etanol. Mais de 42% da energia e 13% dos combustíveis consumidos em transporte no Brasil são renováveis. No resto do mundo, em média, apenas 13,2% da energia vem de fontes renováveis (ANP, 2015). Os EUA são o maior produtor e consumidor de etanol do mundo com quase 30 bilhões de litros produzidos em 2008, e possui um mercado interno em torno de 60 bilhões de litros, considerando a mistura de 10% de etanol em toda gasolina consumida no país (CORTEZ, 2010).

A matéria-prima lignocelulósica é, portanto, uma fonte potencial de materiais de partida para muitos processos industriais, onde a grande vantagem deste bio-material é que não afetará o abastecimento de alimentos (LUCIA, 2008). Ademais, a produção de bioetanol 2G é considerada uma tecnologia verde para mitigação de emissões de gases que provocam o efeito estufa e de substituição parcial de combustíveis fósseis, como a gasolina (SAINI et al., 2015). Além disso, o potencial global da produção de bioetanol pode substituir cerca de 29% do total de gasolina mundial (KAHRA et al., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar as etapas de hidrólise e fermentação do caldo hidrolítico da palha e do sabugo de milho para produção de etanol de segunda geração, analisando diferentes condições de processo.

2.2 Específicos

- ✓ Realizar pré-tratamento com ácido diluído na palha e sabugo de milho;
- ✓ Submeter a palha e o sabugo já pré-tratados à hidrólise enzimática com o objetivo de estudar a conversão da celulose em açúcares redutores;
- ✓ Realizar experimentos de fermentação etanólica do hidrolisado, empregando a levedura *Sacharomyces cerevisiae*, com o objetivo de avaliar a eficiência de fermentação através da conversão da glicose a etanol.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A cultura do milho

O milho (*Zea mays spp.*), também conhecido como Abati, Auati e Avati é originário do México (CABRAL et al., 2012). Conhecido botanicamente como cariopse, o grão de milho é formado por quatro principais estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo e ponta, as quais diferem em composição química e também na organização dentro do grão (PAES, 2006 apud CINELLI, 2012). Adicionalmente, pertencente à família Poaceae, pode alcançar até dois metros de altura e seus grãos inseridos em fileiras no sabugo formam assim a espiga, sendo revestida por pericarpo (CABRAL et al., 2012).

O milho é uma espécie monóica, isto é, possui dois sexos na mesma planta. As flores masculinas localizam-se na panícula terminal conhecida como “flecha” ou “pendão” e as femininas em espigas auxiliares. A espiga é constituída por um eixo ou ráquis (sabugo), ao longo do qual se desenvolvem centenas de ovários, cada um com um saco embrionário (PATEMIANI; CAMPOS, 1990 apud PEREIRA, 2006).

A expansão da cultura do milho caracteriza-se como uma grande fonte econômica no Brasil, tendo em vista que seu cultivo abrange muitas regiões do país e sua produção vem progredindo a cada ano. Com esse crescimento têm surgido várias inovações tecnológicas, tais como os novos sistemas de plantios (diretos e em consórcio). Neto et al. (2013) demonstraram em seus trabalhos que a maior quantidade de palha produzida foi no sistema de plantio direto, com uma produção de 9.161,16 kg/ha, enquanto que no plantio convencional sob as mesmas condições de campo essa produção foi apenas de 4.306,96 kg/ha.

3.1.1 Utilização do milho e o aproveitamento da palha e do sabugo

O milho (*Zea mays*) é considerado como uma das 'culturas inteligentes', porque ele tem o potencial para produzir alimentos, ração animal e combustível (NDIMBA et al., 2013). O principal destino da safra do milho são as indústrias de rações para animais e para alimentação humana, como mostra a Figura 1. O grão também é transformado em óleo, farinha, amido, margarina, xarope de glicose e flocos para cereais matinais (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2015). Também usado na produção de elementos espessantes e corantes e na produção de óleos.

Figura 1 - Principais utilizações da cultura do milho.



Fonte: Adaptada de CANAL DO PRODUTOR, 2010; AGROCIM, 2010.

Após a utilização dos grãos de milho são gerados os resíduos (palha e sabugo), os quais podem ser aproveitados como matéria-prima não só para produção de novos produtos, mas também atribuir alguma finalidade, como Januário et al. (2009) reportou em seus estudos a capacidade do sabugo de milho para adsorver o azul de metileno, um corante catiônico, e também de adsorver a eosina, um corante aniônico visando a sua utilização como alternativa ao carvão ativo.

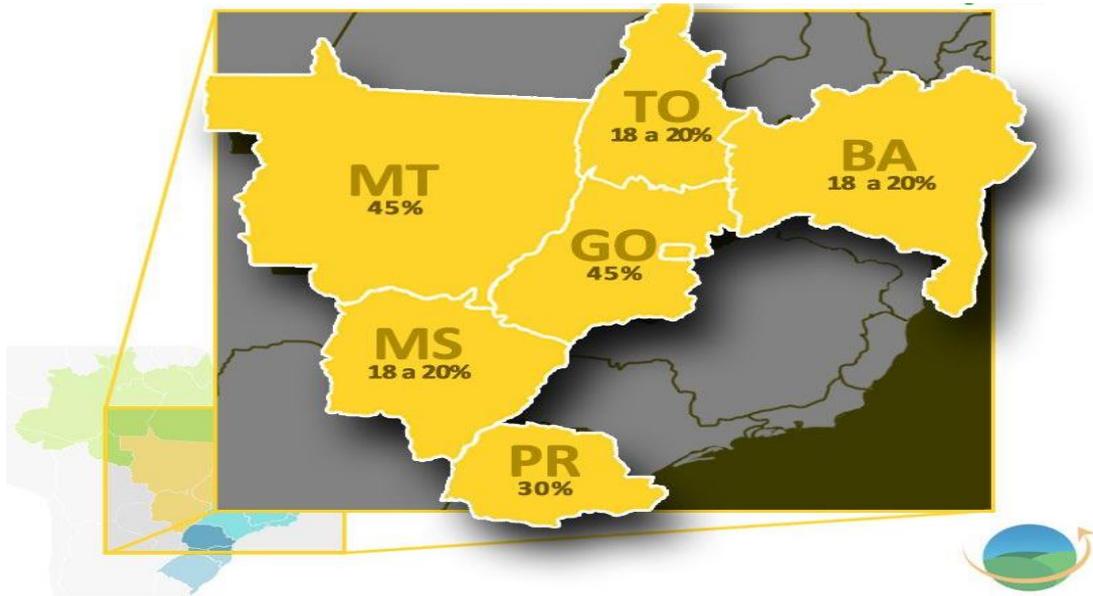
A palha de milho é geralmente incinerada ou utilizada como cama nos criadouros de aves nas propriedades rurais brasileiras. Apesar de ser um material abundante, é pouco aproveitado para gerar renda, exceto quando destinado ao artesanato (PAES et al., 2015).

Nesse âmbito, a palha e até mesmo o sabugo, vêm sendo utilizados para vários fins (CABRAL et al., 2012), especialmente para produção de etanol 2G, pois possuem açúcares disponíveis em sua composição.

3.1.2 O mercado do milho

O Brasil tornou-se referência como um dos maiores produtores de alimentos. Convém ressaltar que o País é, no *ranking* mundial, o terceiro produtor e o segundo exportador de milho (SILVA JR, 2015). Cultivado em diferentes sistemas produtivos, o milho é plantado e comercializado principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil como mostra a Figura 2 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2015). Em Santa Catarina, o milho representa 70% do custo da nutrição dos plantéis de aves e suínos, que produzindo cerca de 4 milhões de toneladas de milho (LANZNASTER, 2014).

Figura 2 - Localização da região de plantio e comercialização de milho 2015/16 no Brasil



Fonte: www.noticiasagricolas.com.br

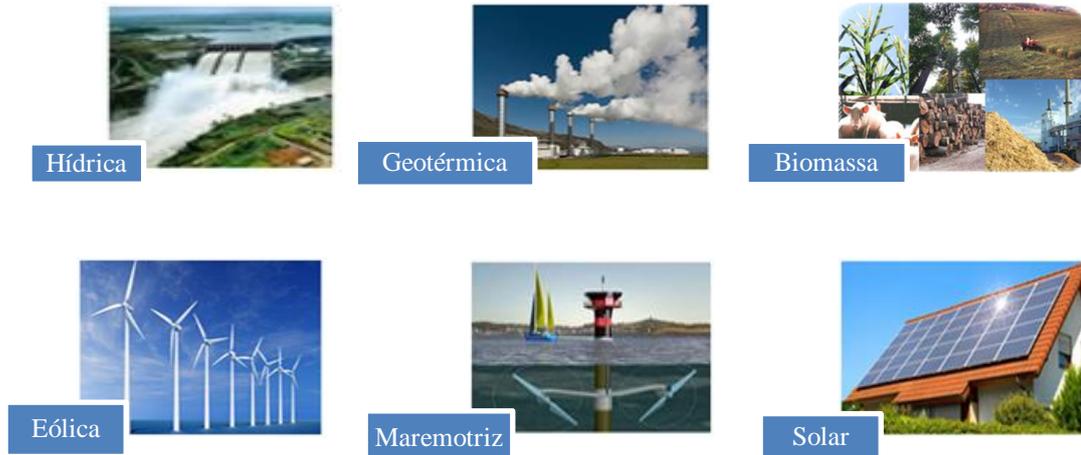
A cultura do milho também apresenta uma importância significativa nos Estados Unidos. Existem, atualmente, mais de 200 instalações de produção de etanol a partir do milho. Além disso, outras unidades estão em construção ou em fase de planejamento, onde a maioria das unidades produtivas está localizada na região conhecida como cinturão do milho (*corn belt*) (CINELLI, 2012). A produção de etanol em 2004 foi cerca de 3,4 bilhões de galões, e tem crescido em torno de 20% ao ano. Eles produzem mais de 3 bilhões de galões de etanol por ano em mais de 75 usinas, isso devido ao crescimento da produtividade das plantações de milho, uso mais eficiente dos fertilizantes e aumento da eficiência das usinas de etanol, resultando em um balanço positivo para a produção de álcool a ser usado como combustível (HINRICHS et al., 2010).

Em suma, o milho é um cereal cultivado em boa parte do mundo, tornando-se uma importante fonte de utilização.

3.2 Fontes renováveis de energia

As fontes de energias renováveis constituem várias alternativas para expandir a oferta de energia e atender a demanda mundial, e para tanto, é necessário se adequar ao conceito de sustentabilidade. Dessa forma, merecem destaque as fontes renováveis apresentadas na Figura 3:

Figura 3 - Fontes renováveis de energia.



Fonte: Adaptada de IGUIECOLOGIA, 2015; ISTO É, 2016.

Segundo Carli (2011), apesar do petróleo ser o principal combustível utilizado, ele traz um amplo histórico de danos ambientais, conflitos e, ademais, é uma fonte não renovável de energia. Em oposição a esse combustível fóssil, os materiais lignocelulósicos provenientes de biomassa são facilmente renováveis, barato e ambientalmente benignos (LUCIA, 2008).

3.2.1 Biomassa: fonte lignocelulósica

A busca de um novo padrão energético e a configuração de um arranjo produtivo baseado no uso de biomassa vem impulsionando uma série de pesquisas e inovações (SILVA, 2012). O custo da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos está sendo cada vez mais viável com o desenvolvimento das pesquisas neste sentido (CARLI, 2012). A biomassa lignocelulósica é o recurso mais abundante e bio-renovável com grande potencial de produção sustentável de produtos químicos e combustíveis de valor agregado a partir de biomassa lignocelulósica, com ênfase na sua componente principal, celulose (ZHOU et al., 2011). Assim, é necessário desenvolver tecnologias que permitam o uso de novas e abundantes fontes de biomassa celulósica, resultando em maior rendimento específico por área cultivada que as tecnologias de primeira geração (PALACIO et al., 2012).

De acordo com Perdices et al. (2012), o uso energético da biomassa é baseado na utilização de:

- ✓ Resíduos primários: resíduos agrícolas e florestais;

- ✓ Resíduos secundários: indústrias madeireiras, moveleira, resíduos de processamento de alimentos, da produção de carvão vegetal, da criação de animais, etc);
- ✓ Resíduos terciários: decorrentes do consumo de alimentos e materiais.

De acordo com Hinrichs et al. (2010), a biomassa pode ser utilizada como combustível nas seguintes formas:

- ✓ Combustíveis sólidos, como as lascas de madeira;
- ✓ Combustíveis líquidos produzidos a partir da ação química ou biológica sobre a biomassa sólida e/ou da conversão de açúcares vegetais em etanol ou metanol;
- ✓ Combustíveis gasosos produzidos por meio do processamento com alta temperatura e alta pressão.

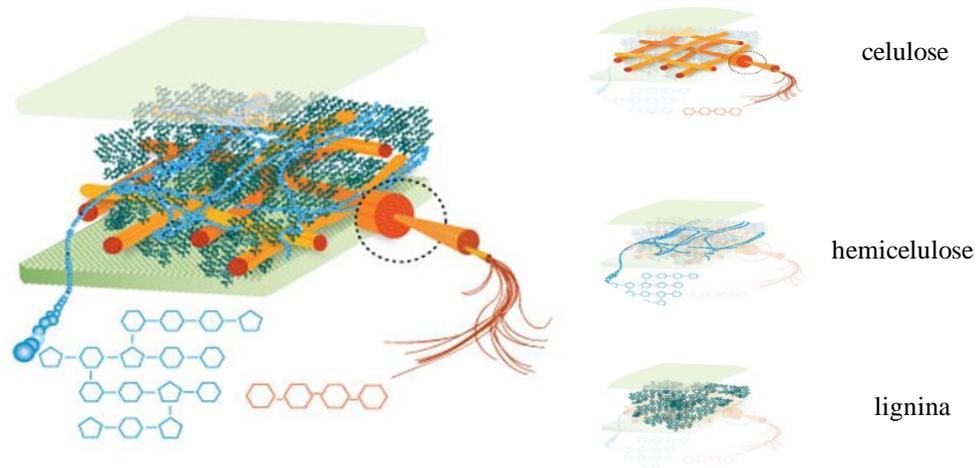
Ainda para os mesmos autores, o sabugo de milho, o pé de milho e outros produtos que normalmente poderiam ser descartados, são exemplos de fontes potenciais de combustível líquido obtido a partir da biomassa.

A inovação em processos biotecnológicos que aproveitem esses resíduos surge com grande potencial devido à possibilidade de agregar valor a uma matéria-prima subutilizada (CINELLI, 2012). Terras com florestas e de agricultura podem suprir 1,3 bilhões de toneladas secas de biomassa por ano, o suficiente para substituir um terço da demanda de combustíveis para transporte (HINRICHS et al., 2010).

3.2.1.1 Composição lignocelulósica: celulose, hemicelulose e lignina

A biomassa lignocelulósica é a matéria-prima mais abundante do planeta, onde a parede celular da planta é composta principalmente por feixes alinhados de celulose (homopolímero de glicose) embebidos numa matriz ligados de forma covalente à hemicelulose (principalmente heteropolímero de xilose, arabinose, glucose, galactose, manose), lignina (polímero aromático), extrativos e vários inorgânicos, estruturas responsáveis por criar uma barreira natural contra a ação de microrganismos como pode ser visto na Figura 4. (TAHERZADEH e KARIMI, 2007; LUCIA, 2008; LANGAN et al., 2014; KAHRA et al., 2013; CARLI, 2011).

Figura 4 - Estrutura dos materiais lignocelulósicos.



Fonte: Adaptada de BORTOLAZZO, 2011.

O fracionamento de materiais lignocelulósicos pode ser um método para melhorar a utilização geral de biomassa. Quando separados, a celulose, hemicelulose e lignina podem ser usados em aplicações diretas ou precursores de produtos químicos industriais (YOO et al., 2011).

Os carboidratos são os componentes principais estrutural das paredes celulares de uma boa parte da biomassa. Estes hidratos de carbono são polissacáridos construídos principalmente de glucose, xilose, arabinose, galactose, manose e subunidades monoméricas (SLUITER et al., 2008; ZHOU et al., 2011). Essas estruturas são compostas por aproximadamente 36 cadeias que são embaladas por ligações de hidrogênio, que por sua vez, são embaladas nas chamadas microfibras, onde as fibras elementares estão ligadas umas às outras por hemiceluloses, polímeros amorfos de diferentes açúcares bem como outros polímeros, tais como a pectina e cobertos por lignina. As microfibras estão frequentemente associadas sob a forma de feixes ou macrofibras (TAHERZADEH; KARIMI, 2007). Em virtude dessa complexa estrutura química e morfológica, existe a dificuldade da conversão da biomassa em biocombustíveis ou outros produtos de interesse (CARLI, 2011; SANTOS et al., 2012).

A quantidade de celulose, hemicelulose e lignina nos materiais lignocelulósicos geralmente se baseiam nas proporções de 40 a 60% de celulose, 15 a 50% de hemicelulose, 10 a 30% de lignina (LORA et al., 2012; CARLI, 2011) e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos. Esta composição química varia em função do tipo de biomassa (SANTOS et al., 2012), como mostra a Tabela 1. A estrutura e composição da biomassa têm forte influência nos rendimentos dos processos de hidrólise e fermentação. Sendo que a composição básica da

biomassa lignocelulósica depende do vegetal de origem e, no caso de biomassa agroflorestais residuais, da região, idade e período de coleta do material (SILVA, 2010).

Tabela 1 - Composição química parcial de alguns materiais lignocelulósicos

Material lignocelulósico	celulose (%)	hemicelulose (%)	lignina (%)
Farelo de cevada	23,0	32,7	24,4
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3
Folhas de milho	37,6	34,5	12,6
Bagaço de cana	40,2	26,4	25,2
Palha de arroz	43,5	22,0	17,2
Palha de trigo	33,8	31,8	20,1
Palha de sorgo	34,0	44,0	20,0
Casca de aveia	30,5	28,6	23,1
<i>Eucalyptus grandis</i>	40,2	15,7	26,9
<i>Eucalyptus globulus</i>	46,3	17,1	22,9

Fonte: Adaptada de TAMANINI & HAULY, 2004; CANETTIERI et al., 2001; MUSSATO & ROBERTO, 2002 apud SILVA, 2010.

A celulose e a hemicelulose são os dois componentes principais das plantas e que definem sua estrutura (PALACIO et al., 2012), sendo a celulose o principal componente estrutural das paredes celulares rígidas e dos tecidos fibrosos e lenhosos das plantas (OETTERER et al., 2006). A celulose pode ser convertida em etanol celulósico, ou utilizada em aplicações alimentares e farmacêuticas (YOO et al., 2011).

A estrutura da hemicelulose não é cristalina, e ao contrário da celulose é facilmente hidrolisada. A hemicelulose, composta principalmente de xilose e arabinose (CARLI, 2011), pode ser convertida em furfural, hidrogênio, ácido succínico, xilitol, e xilo-oligossacáridos (YOO et al., 2011).

Outro constituinte importante dos materiais lignocelulósicos é a lignina, cuja função principal é promover sustentação a toda esta estrutura. Ela é formada por uma complexa estrutura de polímeros amorfos e possui características hidrofóbicas (CARLI, 2011). Também proporciona rigidez e proteção contra o ataque de microrganismos e agentes químicos aos açúcares estruturais da planta (celulose e hemicelulose). Por conseguinte, dificulta a exploração tecnológica de materiais biológicos para a produção de biocombustíveis, promovendo a “recalcitrância” da biomassa (HIMMEL, 2008 apud LORA et al., 2012).

O aumento na utilização de materiais lignocelulósicos como insumos nas biorrefinarias leva a produção de grandes quantidades de lignina residual. Portanto, deve-se

considerar a forma na qual a lignina poderá ser mais bem aproveitada, seja para a geração de energia, ou para a obtenção de produtos químicos (CHEMISTRY INNOVATION, 2008 apud LORA et al., 2012). A lignina fracionada pode ser diretamente queimada para a produção de calor pelo processo de combustão (YOO et al., 2011) e pode ser utilizada como fonte de carbono através do processo de gaseificação para obtenção de gás de síntese, o qual, por sua vez, pode ser transformado em metanol, dimetil éter, olefinas e álcoois misturados. Além disso, a lignina pode ser convertida em hidrocarbonetos aromáticos, que podem ser utilizados comercialmente, como, por exemplo, vanilina ou fenol (CHEMISTRY INNOVATION, 2008 apud LORA et al., 2012).

A decomposição de lignina e hemicelulose é geralmente mais fácil do que a da celulose. Em outras palavras, a decomposição e a degradação da celulose é o passo mais difícil e consumidor de energia, na conversão de biomassa lignocelulósica (ZHOU et al., 2011).

3.3 Biorrefinarias

A definição de biorrefinaria foi construída por grupos de pesquisas que buscavam o desenvolvimento de tecnologia para a produção de etanol de segunda geração. Os esforços nesta temática já apresentam expressivos resultados, traduzidos pela construção de dezenas de unidades, algumas já em operação, para a produção deste biocombustível (PEREIRA JR, 2010). Na Tabela 2, podem ser observados exemplos de unidades que utilizam os resíduos de milho como matéria-prima.

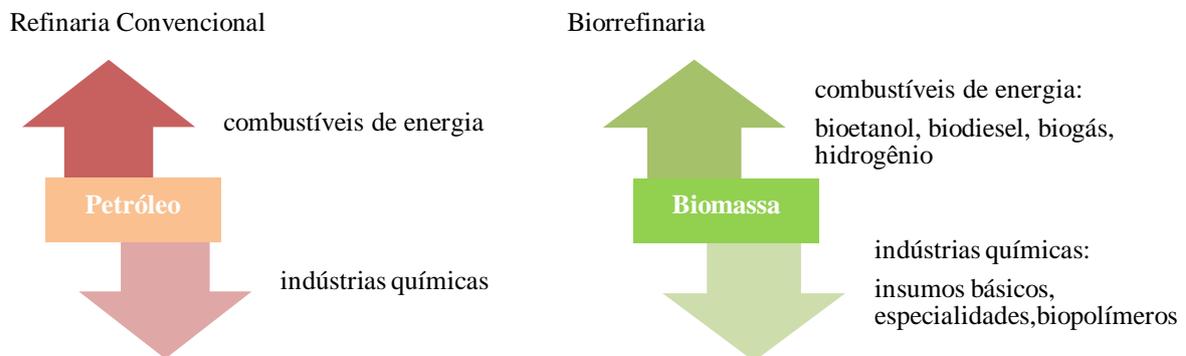
Tabela 2 - Empresas que utilizam os resíduos de milho para a produção de etanol celulósico no mundo.

empresa/localização	tecnologia	matéria-prima	abertura
Abengoa/York	hidrólise enzimática	resíduos de milho, etc	2007
Abengoa/Hugoton	hidrólise enzimática	resíduos de milho, etc	2011
AE Biofuels/Butte	hidrólise enzimática	caule de milho, etc	2008
ICM/Colwich	hidrólise enzimática	resíduos de milho, etc	2010
Iogen/Shelley	hidrólise enzimática	resíduos de milho, etc	2010
Pacific Ethanol/Boardman	hidrólise enzimática	resíduos de milho, etc	2010
POET/Emmetsburg	hidrólise enzimática	fibra de milho, milho	2009
Suncor Energy/Commerce City	hidrólise enzimática	fibra de milho, etc	2012
COFCO/China	-	resíduos de milho	2008

Fonte: Adaptada de ETHANOL STATISTICS, 2008 apud PERDICES et al., 2012

As matérias primas lignocelulósicas apresentam um fator de implantação em larga escala, visto que são provenientes de resíduos. É neste contexto que se concentra o desenvolvimento das biorrefinarias, cujo objetivo principal é a obtenção simultânea de produtos químicos e biocombustíveis a partir de biomassa, minimizando assim a dependência do setor petroquímico. Diferentemente das refinarias de petróleo, as biorrefinarias utilizam recursos renováveis com mínima geração de resíduos e emissões de gases poluentes (LORA et al., 2012), como mostra a Figura 5.

Figura 5 - Instalações industriais: refinaria convencional x biorrefinaria.



Fonte: Acervo do autor, 2016.

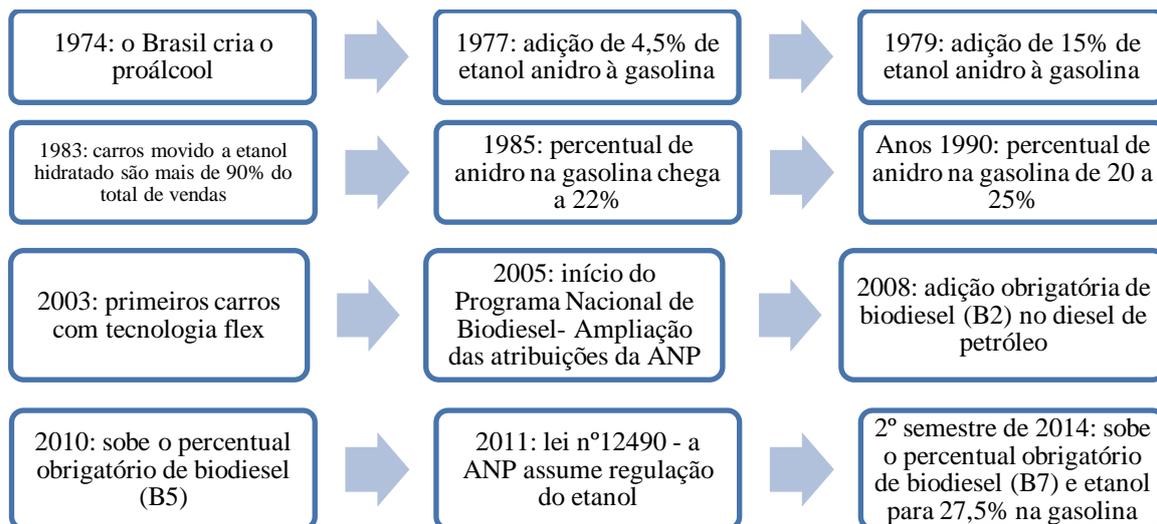
Segundo Pereira Jr (2010), o Brasil encontra-se em posição privilegiada para liderar no aproveitamento das biomassas, por ser um dos maiores potenciais de matérias-primas renováveis do planeta e por ser o principal receptor de recursos de investimentos, provenientes do mercado de carbono no segmento de produção e uso de bioenergia.

3.4 Biocombustíveis: Bioetanol

A utilização de biocombustíveis, como exemplos podemos citar o biodiesel, o etanol, o carvão vegetal (PALACIO et al., 2012), surge como alternativa de mitigar a pressão exercida pelos combustíveis fósseis e seus derivados, pois são substâncias derivadas de biomassa renovável (GONÇALVES et al., 2011; ANP, 2015). Eles são uma fonte promissora direta e imediata de substituição dos combustíveis líquidos usados no transporte e podem ser integrados aos sistemas logísticos atualmente em operação (PALACIO et al., 2012). Essa nova visão aumentou o interesse na conversão de biomassa em etanol (SILVA, 2012) e tem recebido considerável atenção nos últimos anos (HINRICHS et al., 2010).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol. Seu custo tornou-se competitivo, cerca de 30 anos decorridos desde a criação do Proálcool com o intuito de reduzir a dependência da importação do álcool. Em 2003, um fato marcou o surgimento de um novo impulso: a introdução dos veículos biocombustíveis (*flex fuel*) no mercado brasileiro, que deu início a uma nova onda de dinamismo no país. Promovidos por incentivos fiscais e combinados com os elevados preços do petróleo, os veículos biocombustíveis levaram ao rápido crescimento na produção de etanol. O Brasil tinha um programa pioneiro para produzir álcool para automóveis desde a década de 1920 e foi o líder mundial na produção e da comercialização de etanol, como mostra a Figura 6. Entretanto, em 2005 os Estados Unidos ultrapassaram o Brasil, assumindo o posto de maior produtor mundial (CINELLI, 2012).

Figura 6 - Evolução dos biocombustíveis no Brasil



Fonte: Adaptada de ANP, 2016.

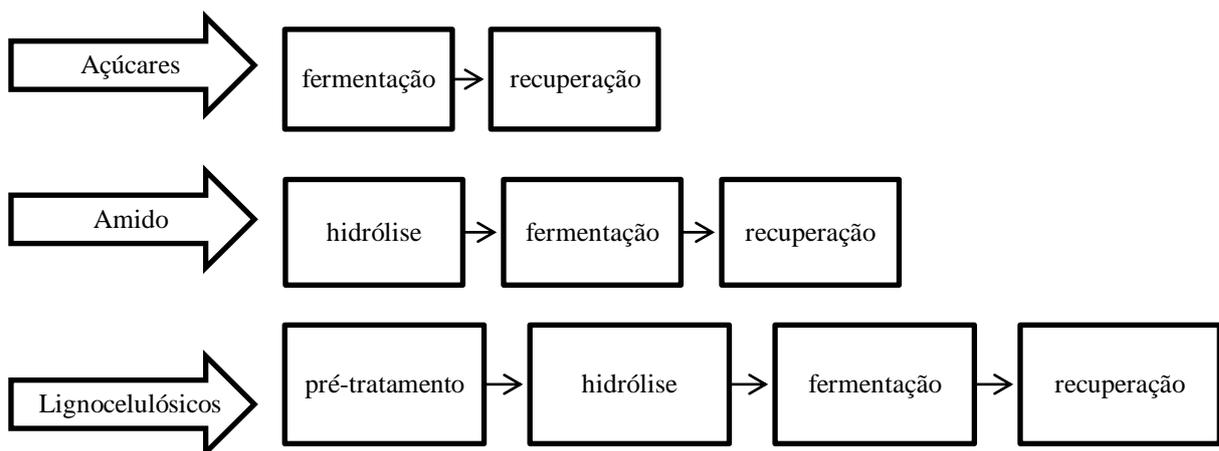
Para Palacio et al. (2012) e Rosillo-Calle (2010), os biocombustíveis podem ser obtidos através dos seguintes processos:

- ✓ Pirólise de materiais biológicos compostos principalmente de celulose, proteínas e/ou óleos vegetais para a obtenção de um “bio-óleo”, que pode ser utilizado como uma mistura de diesel ou substituto.
- ✓ Hidrólise da celulose e da hemicelulose.

- ✓ Gaseificação de diferentes biomassas para a produção de gás de síntese, a partir do qual é possível a obtenção de biocombustíveis líquidos por vários processos catalíticos.
- ✓ Digestão anaeróbica da celulose proveniente de resíduos agrícolas ou culturas para a obtenção de metano.
- ✓ Algas (biodiesel, biogás e bio-hidrogênio).
- ✓ Aproveitamento da glicerina para a produção do hidrogênio.

Os países desenvolvidos investem fortemente na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, tanto por hidrólise como por rotas de gaseificação (CORTEZ, 2010), as quais podem ser observadas na Figura 7.

Figura 7 - Etapas da produção de bioetanol de acordo com a matéria-prima.



Fonte: Adaptada de PERDICES et al., 2012

Em termos de volume e de mercado, o etanol é o produto mais importante da biotecnologia (TAHERZADEH; KARIMI, 2007). Para cada 1000 Kg de milho, é produzido 330 litros de etanol (MOURA; FERNANDES, 2012 apud CABRAL et al., 2012).

3.4.1 Etanol lignocelulósico (etanol 2G)

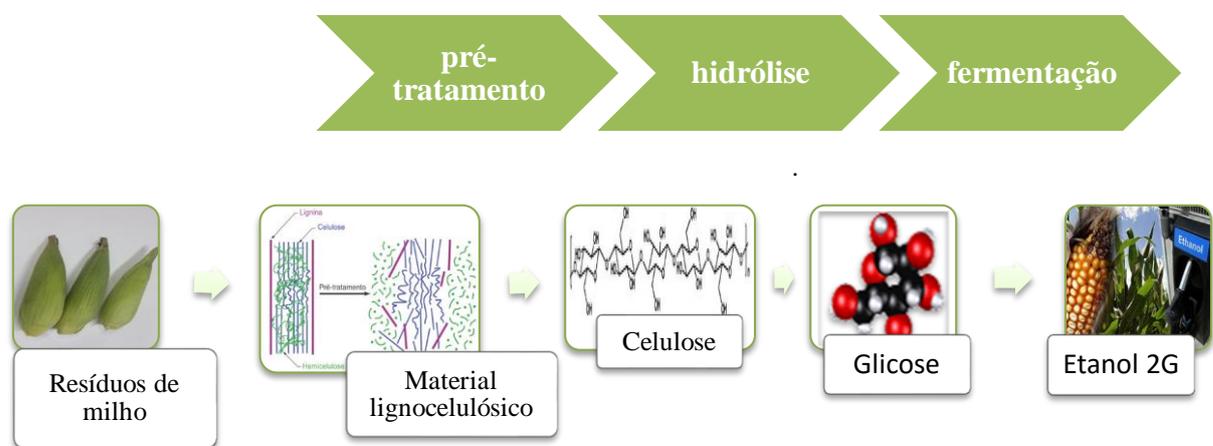
Há uma corrida incessante para desconstruir a biomassa lignocelulósica e obter etanol de segunda geração (REVISTA FAPESP, 2013) em larga escala, pois sua produção não afeta a de alimentos, podendo produzir mais etanol de uma mesma área plantada. Isto é possível, pois a matéria-prima será materiais lignocelulósicos, tais como a palha e o sabugo de milho,

os quais são formados por celulose e que por hidrólise podem ser transformados em etanol 2G (ROSILLO-CALLE, 2010; REVISTA INOVAÇÃO UNICAMP, 2013).

A grande vantagem da produção de biocombustíveis pela rota tecnológica de segunda geração está no fato de que as mesmas não estão limitadas as matérias-primas utilizadas na rota tecnológica de primeira geração, podendo usufruir de uma grande variedade de biomassa e com isso, proporcionar melhores índices de sustentabilidade, tendo como resultado deste processo a obtenção de combustível renovável, e coprodutos com alto valor agregado (LORA et al., 2012; PALACIO et al., 2012). Alguns vegetais cultivados em locais inóspitos, resíduos agroindustriais e urbanos de origem vegetal permitirá elevada abrangência geográfica, aumento significativo na oferta de energia limpa e aumento na produção de etanol sem a necessidade de expansão no uso de terras agricultáveis (GONÇALVES et al., 2011).

O processo de produção de etanol 2G compreende, basicamente, as etapas de pré-tratamento, hidrólise e fermentação, como mostra a Figura 8:

Figura 8 - Representação esquemática da produção de etanol a partir de resíduos de milho



Fonte: Adaptada de MOSIER, 2005; SANTOS et al., 2012.

3.4.2 Bioetanol e o meio ambiente

O acelerado crescimento econômico trouxe um aumento na demanda energética e uma preocupação maior com a diminuição da oferta de derivados de petróleo (SILVA, 2012). Assim, fontes de biomassa lignocelulósica estão apresentando um rico desenvolvimento como combustíveis alternativos para transporte, especialmente por causa dos novos padrões aceitos de poluição atmosférica (LUCIA, 2008; HINRICHS et al., 2010).

A reutilização de resíduos nas indústrias químicas é uma necessidade não só do ponto de vista ambiental, mas também uma forma de evitar desperdício de um material, em forma de matéria-prima, que pode vir a gerar lucros nos novos produtos (RABELO et al., 2010). A reutilização e reciclagem destes resíduos minimizam os problemas ambientais ligados ao seu acúmulo e diminui o consumo de combustíveis fósseis. No Brasil, apesar da grande produção de etanol a partir da sacarose de cana-de-açúcar, a produção de álcool a partir de fontes alternativas de substrato como a utilização do bagaço de cana, pode ser interessante e economicamente viável para a produção de combustíveis ambientalmente corretos (CARVALHO, 2011).

As indústrias químicas geram muitos resíduos perigosos que são liberados a um ritmo vertiginoso provocando emissão de gases do efeito estufa, principalmente o CO₂. Críticos têm sugerido que uma forma de compensar essa poluição ambiental é utilizar as matérias-primas lignocelulósicas que representa grande quantidade de biomassa (LUCIA, 2008). O oxigênio presente no bioetanol melhora a combustão e, portanto, reduz as emissões de poluentes atmosféricos, tais como os hidrocarbonetos, monóxidos de carbono e de particulados. Apesar de que a maior parte das pesquisas científicas concordarem que os biocombustíveis promovem menos emissões de gases de efeito estufa (entre 35 a 50%), o bioetanol 2G (que deve começar a ser comercializado entre 2010 e 2015) poderia diminuí-las em torno de 70% (PERDICES et al., 2012).

O uso maciço de etanol é considerado um dos principais mecanismos de redução dos gases do efeito estufa, pois parte das emissões de gás carbônico é reabsorvida pelas plantações no processo de fotossíntese (ANP, 2015). Todavia, é necessário aprimorar as cadeias de produção de etanol, com o intuito de aumentar a produção e minimizar os impactos negativos ao meio ambiente. Diante disso, surge a possibilidade de aproveitamento de resíduos agrícolas, tais como a palha e o sabugo de milho como uma alternativa promissora de produção e diminuição da degradação ambiental.

3.5 Tecnologias de conversão

Estima-se que quase metade dos carbonos orgânicos na biosfera está presente sob a forma de celulose. Portanto, no contexto do tratamento de biomassa lignocelulósica em combustíveis e produtos químicos valiosos, a conversão de celulose é de suma importância e valor a ser dada prioridade (ZHOU et al., 2011).

3.5.1 Pré-tratamento da biomassa

Algumas técnicas de pré-tratamentos têm sido propostas com o intuito de aumentar a digestibilidade dos materiais lignocelulósicos, e facilitar bioconversão. Tais técnicas são baseadas em processos físicos, químicos, biológicos ou na combinação destes (CARVALHO, 2011), como mostra a Figura 9.

Figura 9: Efeito de diferentes pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos

Pré Tratamento	Características Composicionais			Vantagens	Desvantagens	
	celulose	hemicelulose	lignina			
Físico	Moinho de bolas	intensiva diminuição do grau de cristalinidade	não remove	não remove	redução de cristalinidade	alto consumo de energia
	Ácido diluído	pouca despolimerização	80 a 100% de remoção	pouca remoção, mas ocorre mudança na estrutura	condições médias, altas produção de xilose	difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso
	Hidróxido de sódio	inchaço significativa	considerável solubilidade	considerável solubilização > 50%	remoção efetiva de ésteres	reagente caro, recuperação alcalina
Químico	ARP	menor que 5% de despolimerização	~50% de solubilidade	~70% solubilização	efetiva deslignificação	recuperação alcalina, relativamente caro
	Hidróxido de cálcio	pouca despolimerização	significativa solubilização	solubilização parcial (~40%)	efetiva remoção de lignina e acetil, baixo custo	menor efetividade devido a pouca solubilidade da cal
	Ozonólise	não foi observada despolimerização	pequena solubilização	solubilização acima de 70%	efetiva deslignificação em condições suaves	caro, necessidade de mais ozônio
	Organosolv	considerável inchaço	significativo, quase completa	significativo, pode ser quase completa	alta produção de xilose, efetiva deslignificação	recuperação de solvente cara
Biológico	Biológico	20 - 30% de despolimerização	acima de 80% de solubilização	~40% de deslignificação	baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação	perda de celulose, baixa taxa de hidrólise
	Explosão a vapor	pouca despolimerização	80 - 100% de remoção	pouca remoção, mas ocorre mudança na estrutura	energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	degradação da xilana como produto inibitório
Combinado	AFEX	diminuição do grau de cristalinidade	acima de 60% de solubilidade	10 - 20% de solubilização	menor perda de xilanas, não formação de inibidores	recuperação de amônia, não é efetivo para alta concentração de lignina

Fonte: Adaptada de SANTOS et al., 2012.

O pré-tratamento tem a finalidade de romper toda a estrutura da biomassa perturbando as barreiras morfológicas, dinâmicas e mecânicas fazendo com que as moléculas de celulose existentes se tornem acessíveis às enzimas, para então obter uma eficiente conversão em açúcares fermentescíveis (LANGAN et al., 2014; RABELO et al., 2010; SILVA, 2011). Para isso, o pré-tratamento deve ser seletivo e de acordo com a biomassa, pois certamente é a etapa que interfere diretamente em todo o processo produtivo do etanol 2G.

Segundo Baudel (2006), Galbe e Zacchi (2007), para um pré-tratamento ser considerado eficiente, deve apresentar alguns parâmetros, tais como:

- ✓ Ser eficiente em termos de rendimento;
- ✓ Apresentar elevada digestibilidade da celulose na hidrólise enzimática, garantindo acessibilidade aos agentes hidrolíticos;
- ✓ Simplicidade operacional e com segurança;
- ✓ Apresentar elevada concentração de açúcares;
- ✓ Produzir o mínimo de resíduos;
- ✓ Exigir baixo custo global (energia, insumos químicos e utilidades operacionais).

3.5.1.1 Pré-tratamentos físicos

Os métodos físicos têm a finalidade de diminuir a granulometria da biomassa, a fim de aumentar a área superficial de contato e conseqüentemente facilitar a etapa de hidrólise (BAUDEL, 2006; PERDICES et al., 2012).

3.5.1.2 Pré-tratamentos físico-químicos

Dentre as técnicas de pré-tratamento mais estudadas e promissoras, por ser mais barata e efetiva, destaca-se a utilização de ácido diluído que solubiliza e converte a hemicelulose em açúcares fermentescíveis, o que elimina ou minimiza a necessidade de se utilizar hemicelulases nos complexos enzimáticos durante o processo de hidrólise enzimática (SAHA et al., 2005; SANTOS et al., 2012). Esse procedimento se dá pela imersão da biomassa em solução ácida diluída, geralmente utiliza-se ácido sulfúrico com concentrações abaixo de 4%, seguida de aquecimento em torno de 100 a 200°C (GALBE; ZACCHI, 2007).

Em comparação aos procedimentos ácidos, os pré-tratamentos alcalinos operam com parâmetros de temperatura e pressão mais moderados. Para esse procedimento geralmente

utiliza-se hidróxido de sódio e preferencialmente são usados no tratamento de materiais com reduzido teor de lignina (HOLTZAPPLE; KIM, 2005).

O pré-tratamento combinado mais utilizado para hidrólises de materiais lignocelulósicos é o método explosão a vapor. Neste procedimento a biomassa é rapidamente aquecida com vapor saturado, onde esse contato é mantido por determinado intervalo de tempo a fim de promover a hidrólise da hemicelulose. O processo, então, é finalizado com uma súbita descompressão do equipamento. É um método eficiente que atua química e fisicamente na transformação da lignocelulose (PERDICES et al., 2012).

3.5.1.3 Pré-tratamentos biológicos

Os pré-tratamentos consistem na biodeslignificação, degradação biológica da lignina, usando fungos como microrganismo para solubilizar a lignina. A principal vantagem desse processo é o baixo consumo de energia e condições ambientais moderadas. Por outro lado, é um procedimento custoso, com baixos rendimentos e longos tempos de reação (HAMELINK et al., 2005; BALAT et al., 2008).

3.5.2 Hidrólise

As matérias-primas celulósicas encerram em sua composição celulose e hemicelulose e necessitam de hidrólise para serem transformadas em açúcares fermentescíveis (RABELO et al., 2010). Para isto, as enzimas celulasas ou ácidos hidrolisam a celulose a açúcares redutores, que podem ser fermentados por microrganismos a bioetanol (SILVA, 2011). Todavia, a hidrólise da hemicelulose produz principalmente xilose e poucos microrganismos fermentam xilose a etanol (RABELO et al., 2010).

A utilização da biomassa celulósica promove uma corrida mundial pelo domínio do conhecimento. Segundo Kahra et al. (2013), o rendimento da hidrólise é influenciado por vários fatores, tais como temperatura e valor de pH da reação, a concentração de substrato e a velocidade de mistura. Nesse nicho específico, encontra-se a questão da hidrólise enzimática e ácida, além de outras variações entorno das pesquisas (MELO; POPPE, 2010), como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Comparação dos parâmetros do processo e desempenho dos três processos de hidrólise da celulose

Tipo de hidrólise	consumíveis	produção de glicose
ácido diluído	< 1% H ₂ SO ₄	50 - 70%
ácido concentrado	30 - 70% H ₂ SO ₄	90%
enzimática	celulase	75 - 95%

Fonte: Adaptada de HAMELINK et al., 2005

3.5.2.1 Hidrólise ácida

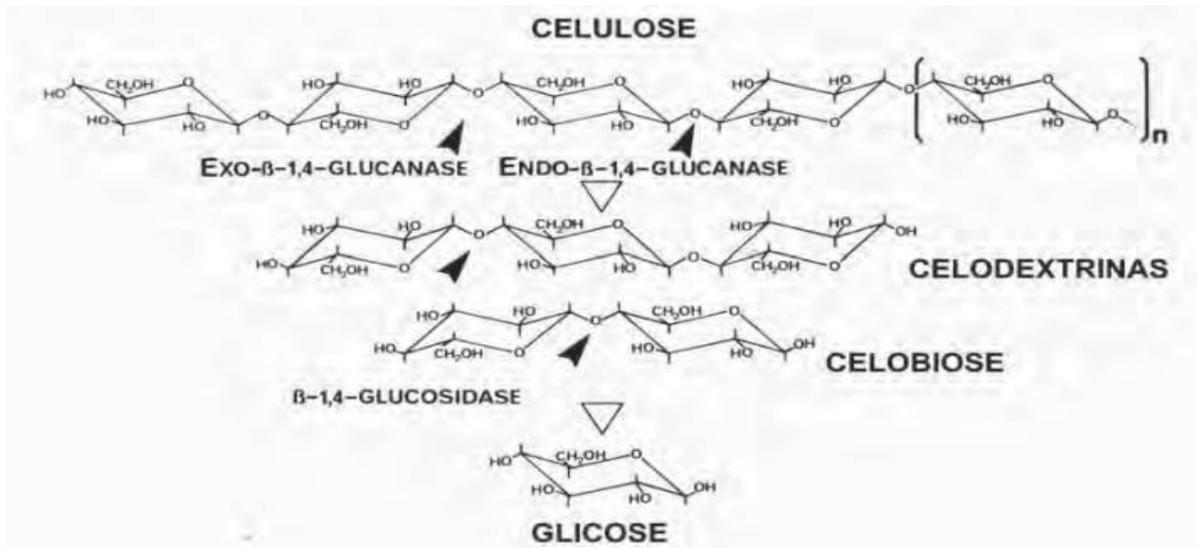
A hidrólise ácida de celulose acontece mais rapidamente, mas pode gerar subprodutos tóxicos ao microrganismo produtor de etanol (GRANDA et al., 2007 apud CARVALHO, 2011). Ela acontece em altas temperaturas e em reatores pressurizados. Neste tipo de hidrólise, se as condições de temperatura e concentração de ácido (sulfúrico ou clorídrico) não forem controladas, ocorrerá degradação dos produtos finais (açúcar e lignina), causando inibição ao metabolismo da fermentação. Ademais, os rendimentos de açúcares obtidos são muito baixos e são necessários reatores caros e resistentes à corrosão (RABELO et al., 2010

3.5.2.2 Hidrólise enzimática

Na hidrólise enzimática, esse processo ocorre catalisado por um coquetel de enzimas em vez de ácidos. Este processo ocorre a condições moderadas, temperaturas em torno de 50 a 60°C (CARLI, 2011), pH na faixa de 4,5 a 5,0 (TAHERZADEH; KARIMI, 2007) sem pressurização, além de ser menos poluente (RABELO et al., 2010). Ela pode ser operada em condições mais brandas, evitando a formação de subprodutos e conduzindo a melhores rendimentos de açúcares fermentescíveis.

As enzimas são substâncias orgânicas compostas por sequências de aminoácidos que atuam como catalisadores em diversas reações bioquímicas. Apresentam conformações com arranjos espaciais e um enovelamento específico, sendo que suas propriedades, estabilidade e função estão relacionadas com sua estrutura tridimensional (CINELLI, 2012). O arranjo celulásico é composto pelas enzimas endoglucanases, as celobiohidrolases ou exoglucanases e as β -glucosidases ou celobiasas, onde cada tipo de celulase ataca uma região da celulose preferencialmente (SILVA, 2011), como mostra a Figura 10.

Figura 10 - Enzimas envolvidas na hidrólise da celulose



Fonte: MALBURG et al., 1992 apud PEREIRA JR, 2010.

Para a etapa de hidrólise enzimática são necessárias altas concentrações de enzima para obter uma melhor conversão da celulose, aumentando seu custo de produto (GRANDA et al., 2007; EKLUND et al., 1990 apud CARVALHO, 2011). Assim, é necessário o desenvolvimento de novas tecnologias para o melhoramento da hidrólise enzimática para obter maiores rendimentos com menos custo. Uma alternativa seria recuperar as enzimas (imobilização) ou utilizar métodos mais eficazes no cultivo dos microrganismos para sintetizar estas enzimas (SILVA, 2011).

3.6 Fermentação

3.6.1 Microrganismo agente da fermentação

O microrganismo mais utilizado para a produção de etanol é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, seguida pela bactéria *Zymomonas mobilis*, onde a fermentação baseia-se na ação desses microrganismos, os quais são responsáveis pela realização do processo, utilizando os açúcares fermentescíveis (VASCONCELOS, 2010). É um processo biológico no qual a energia fornecida por reações de oxidação parcial pode ser utilizada para o crescimento de leveduras e a oxidação parcial anaeróbia da hexose, na produção de etanol e CO₂ (LIMA; MARCONDES, 2002 apud CABRAL, 2015).

A *Saccharomyces cerevisiae* é associada com as fermentações industriais, em particular as fermentações para a produção de etanol carburante (VASCONCELOS, 2010).

Entretanto, ela não possui características para fermentar pentoses (principais constituintes da hemicelulose), apenas as hexoses (GALBE; ZACCHI, 2007). Somente as cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* têm conseguido fermentar xilose em hidrolisados não destoxificados, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Fermentação de hidrolisados a partir de organismos fermentadores de xilose nativos e recombinantes.

organismo	hidrolisado	destoxificação	tipo de fermentação
<i>Escherichia coli</i> KO 11	fibra de milho	+	batelada
<i>Escherichia coli</i> FBR5	resíduos de milho	+	não disponível
<i>Zymomonas mobilis</i> 8b	resíduos de milho	+	batelada
<i>Saccharomy cerevisiae</i>	fibra de milho	+	batelada
424 (LNF - ST)	resíduos de milho	+	batelada
	resíduos de milho	-	batelada
<i>Saccharomy cerevisiae</i>	resíduos de milho	-	<i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i> (SSF), batelada
TMB3400		-	<i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i> (SSF), batelada alimentada

Fonte: Adaptada de HAHN – HAGERDAL et al., 2006 apud PERDICES et al., 2012

A fermentação alcoólica industrial é caracterizada por uma intensa exposição a baixos valores de pH, elevação de temperatura do meio, além do aumento da concentração de etanol que reduz a velocidade específica de crescimento, a velocidade específica de produção de etanol e a viabilidade de células de leveduras (MELO, 2006).

Para Vasconcelos (2010) e Balat et al. (2008), as leveduras devem apresentar alguns parâmetros de desempenho, tais como:

- ✓ Resistência à acidez e temperaturas elevadas;
- ✓ Leveduras com alta velocidade fermentativa;
- ✓ Elevada conversão de açúcares em etanol;
- ✓ Pequena produção de glicerol;
- ✓ Tolerância a altas concentrações de substrato e de etanol e aos inibidores.

Nas fermentações industriais, a necessidade de reduzir os custos de resfriamento do mosto, de obter altas taxas de sacarificação e fermentação, remoção contínua de etanol, e de se obter baixos níveis de contaminação tem estimulado o uso de linhagens de leveduras termotolerantes, como a *Saccharomyces cerevisiae* (MELO, 2006).

3.6.2 Processos fermentativos

Dependendo da integração, o processo pode ser realizado num menor número de etapas (PERDICES et al., 2012) e muitas vezes se faz necessário o multiprocessamento (emprego de enzimas simultaneamente à ação de microrganismo) ou até mesmo a utilização de microrganismos diferentes em etapas sucessivas, ou microrganismos recombinantes, com o intuito de aproveitar ao máximo dos açúcares disponíveis (PEREIRA JR, 2010).

Neste contexto, algumas estratégias com diferentes estágios de desenvolvimento são apontadas, tais como:

- ✓ Hidrólise e fermentação em separado (*Separate Hydrolysis and Fermentation – SHF*).
- ✓ Sacarificação e fermentação simultâneas (*Simultaneous Saccharification and Fermentation – SSF*);
- ✓ Sacarificação com co-fermentação simultâneas (*Simultaneous Saccharification and Co-fermentation – SSCF*);
- ✓ Bioprocesso consolidado (*Consolidated Bioprocess – CBP*).

Além do bom desenvolvimento das leveduras e a escolha da melhor estratégia, o rendimento da fermentação pode ser comprometido devido a alguns fatores do processo (ROCHA et al., 2012; PASCHOALINI e ALCARDE, 2009), tais como:

- ✓ Tempo de fermentação;
- ✓ Concentração de açúcares fermentescíveis;
- ✓ Temperatura de fermentação;
- ✓ Acidez do mosto;
- ✓ Contaminação microbiana;
- ✓ Elevada velocidade de fermentação, pois aumenta a eficiência de transformação de açúcar em álcool, diminuindo o tempo de fermentação e reduzindo os riscos de infecção por microrganismos contaminantes.

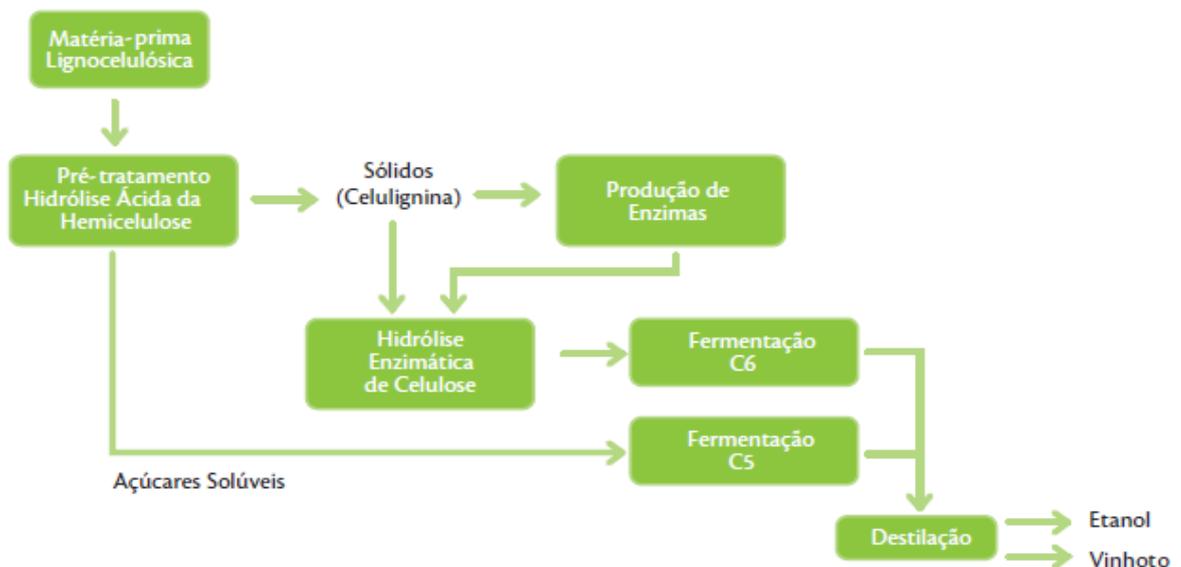
3.6.2.1 Processo com configuração SHF (*Separated Hydrolysis and Fermentation*)

Nos processos em dois estágios, a princípio ocorre a hidrólise e, posteriormente, a fermentação dos açúcares, quando se pode ter a fermentação das pentoses, seguida da

fermentação das hexoses, ou a fermentação simultânea de pentoses e hexoses (RABELO et al., 2010).

A Figura 11 apresenta o fluxograma de um processo utilizando ácido diluído para a hidrólise da fração hemicelulósica, onde posteriormente a celulose é hidrolisada enzimaticamente, antes da etapa de fermentação.

Figura 11 - Fluxograma do processo de hidrólise e fermentação em separado.



Fonte: Wingren et al., 2003 apud Pereira Jr, 2010.

Durante SHF de biomassa lignocelulósica, a quantidade de etanol produzida na etapa de fermentação depende principalmente da concentração de açúcar obtida na etapa de hidrólise. Portanto, para obter maior concentração de etanol e reduzir o tamanho do tanque de fermentação e fluxos de águas residuais, elevadas concentrações de substrato iniciais são preferidos durante SHF (SAINI et al., 2015).

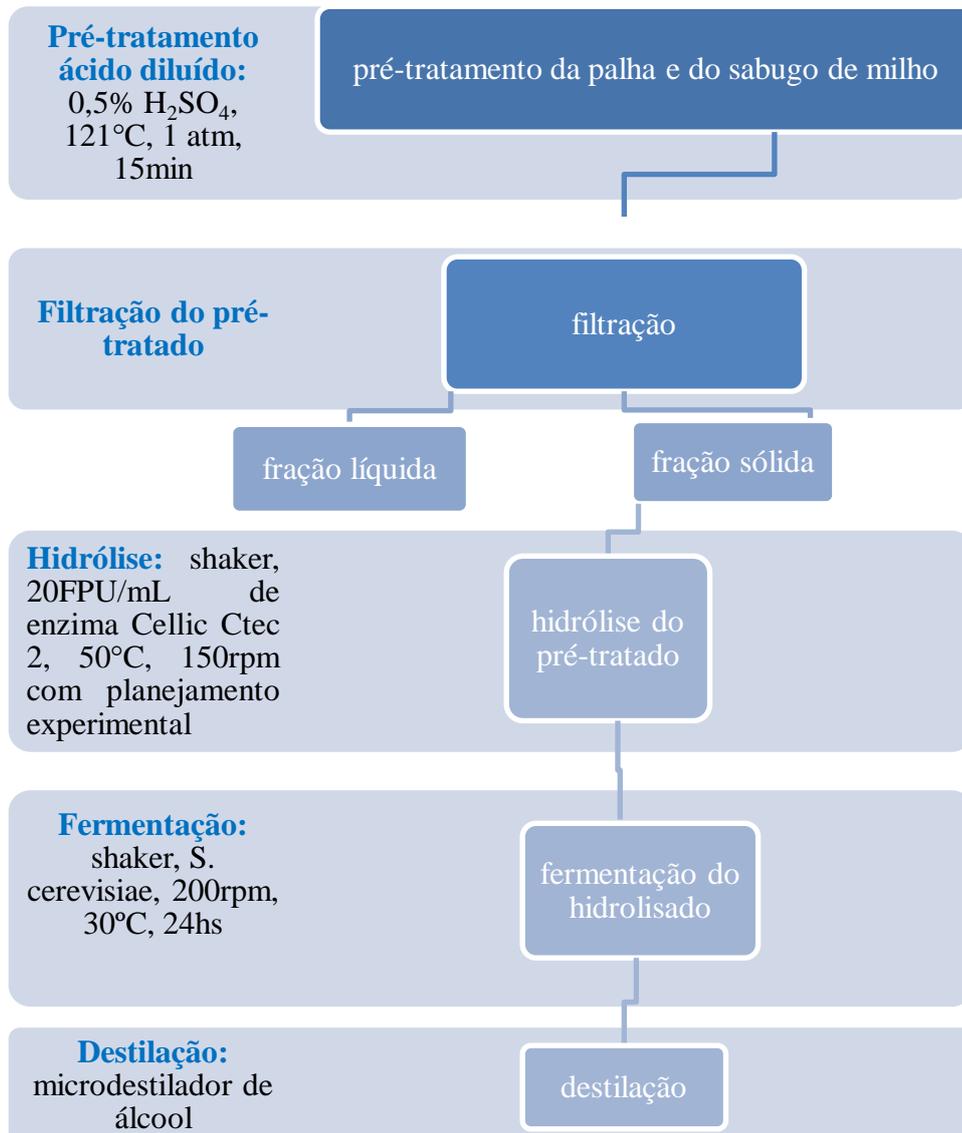
Segundo Carli (2011), a principal vantagem do processo SHF é a possibilidade de se operar a hidrólise e fermentação em suas condições ótimas de pH e temperatura, onde para a hidrólise a temperatura fica entre 40 e 50°C e para a fermentação entre 30 e 37°C. Todavia, a principal desvantagem dessa configuração é a inibição pela celobiose.

Ainda para o mesmo autor, foi reportado os resultados apresentados por Santos et al. (2010), que utilizou a configuração SHF com bagaço de cana pré-tratado com explosão a vapor e conseguiu cerca de 40% de conversão para 10 horas de experimento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia deste trabalho consistiu, inicialmente, no processo de pré-tratamento da matéria-prima, seguida por hidrólise enzimática, fermentação e destilação. Neste trabalho foram avaliadas diferentes condições operacionais detalhadas nas metodologias, divididas conforme ilustrado na Figura 12.

Figura 12 - Fluxograma do procedimento analítico experimental.



Fonte: Acervo do autor, 2016.

4.1 Matéria-prima utilizada

A palha e o sabugo de milho usados nesse estudo foram cedidos pelo Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos (LTBA)/UFAL adquiridos anteriormente nas feiras livres da cidade de Maceió, Alagoas. Os mesmos já se encontravam devidamente sanitizados, secos e triturados sem ajuste de granulometria obtidos em trabalhos anteriores.

O teor de umidade da palha e do sabugo de milho foi avaliado de acordo com o método de aquecimento direto a 105°C até peso constante, empregando determinador de umidade Marconi ID - 50. Esta avaliação se baseia na quantificação do peso, devido à perda de água por evaporação. Foram realizadas quatro determinações a cada 10min, usando-se como resultado final o valor médio das amostras.

4.2 Pré-tratamento ácido

Para a etapa de pré-tratamento, a palha e o sabugo de milho foram pesados em balança analítica e logo após, colocados em Erlenmeyer juntamente com solução de H₂SO₄ 0,5% na proporção de 1:10 (massa de sólido/volume de solução ácida). O procedimento foi conduzido em autoclave à 121°C durante 15 minutos. Após autoclavagem, toda a suspensão foi filtrada em papel de filtro. A fração sólida resultante foi então recolhida e mantida em estufa a 40°C, com o propósito de se obter um material seco (<10% de umidade).

Após o processo de pré-tratamento, foi obtido o rendimento mássico que pode ser determinado de acordo com a Equação 1.

$$\text{Rendimento mássico}(\%) = \frac{m_{final}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (1)$$

onde:

$m_{inicial}$ = massa inicial submetida ao pré-tratamento (g)

m_{final} = massa final após secagem

4.3 Estudo da hidrólise enzimática dos pré-tratados dos resíduos de milho através da técnica de planejamento experimental

O procedimento foi conduzido pela rota enzimática na hidrólise dos resíduos pré-tratados utilizando a enzima *Cellic CTec 2*[®], gentilmente cedida pela *Novozymes*.

De acordo com a carga experimental a ser explorada, foi necessário executar um planejamento experimental para se conhecer o efeito das variáveis, reduzir custos e tempo, baseado nos dados estatísticos do planejamento. Para tanto, utilizou-se o software *STATISTICA*[®], onde as variáveis de interesse foram: carga de biomassa, o tempo de hidrólise e o tipo de biomassa, como se apresenta na Tabela 5.

Tabela 5 - Efeitos e níveis escolhidos para a realização da hidrólise para ambas as biomassas

Efeitos estudados	Nível inferior (-)	Nível superior (+)
1: carga de sólidos (g)	1	5
2: tempo (h)	24	48
3: biomassa (tipo)	Sabugo	Palha

Fonte: Acervo do autor, 2016.

A escolha dos efeitos e níveis seguiram alguns critérios, tais como:

- ✓ Conhecer a influência da carga de biomassa;
- ✓ Diminuir o tempo de hidrólise devido aos custos operacionais, tais como: insumos químicos, serviços e principalmente, energia;
- ✓ Investigar qual das biomassas estudadas melhor corresponde às condições aplicadas.

Os ensaios submetidos à hidrólise enzimática foram preparados na proporção: g de biomassa/ 110 mL de solução, porém de acordo com o planejamento experimental, colocados em *Erlenmeyer* e levados para *Shaker* a 50°C e 150 rpm. A solução continha tampão citrato (50mM), pH 4,8 e 0,5mL de enzima.

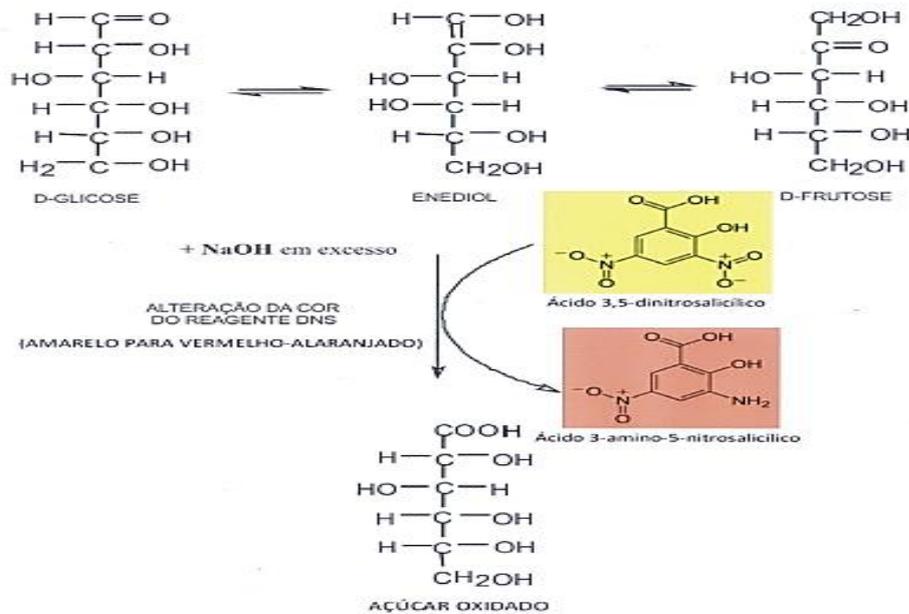
Após a hidrólise enzimática, foi determinado o ART do hidrolisado utilizando o método de DNS. A partir das determinações e análise pelo software *STATISTICA*[®], obtém-se as melhores condições para etapa subsequente de fermentação.

A análise de ART foi obtida por espectrofotometria, através do método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), proposto por Miller (1959). O método se baseia na redução de um de seus grupos nitro ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo

carboxílico, com a formação de um composto (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico) de uma coloração avermelhada com forte absorção em 540nm (CARVALHO, 2011; MALDONADE et al., 2013).

Neste método ocorre a seguinte reação de oxidação ilustrada na Figura 13.

Figura 13 - Reação de redução do ácido dinitrossalicílico pelo açúcar redutor em meio alcalino a ácido 3-amino 5-nitrossalicílico formando açúcar aldônico.



Fonte: MALDONADE et al., 2013.

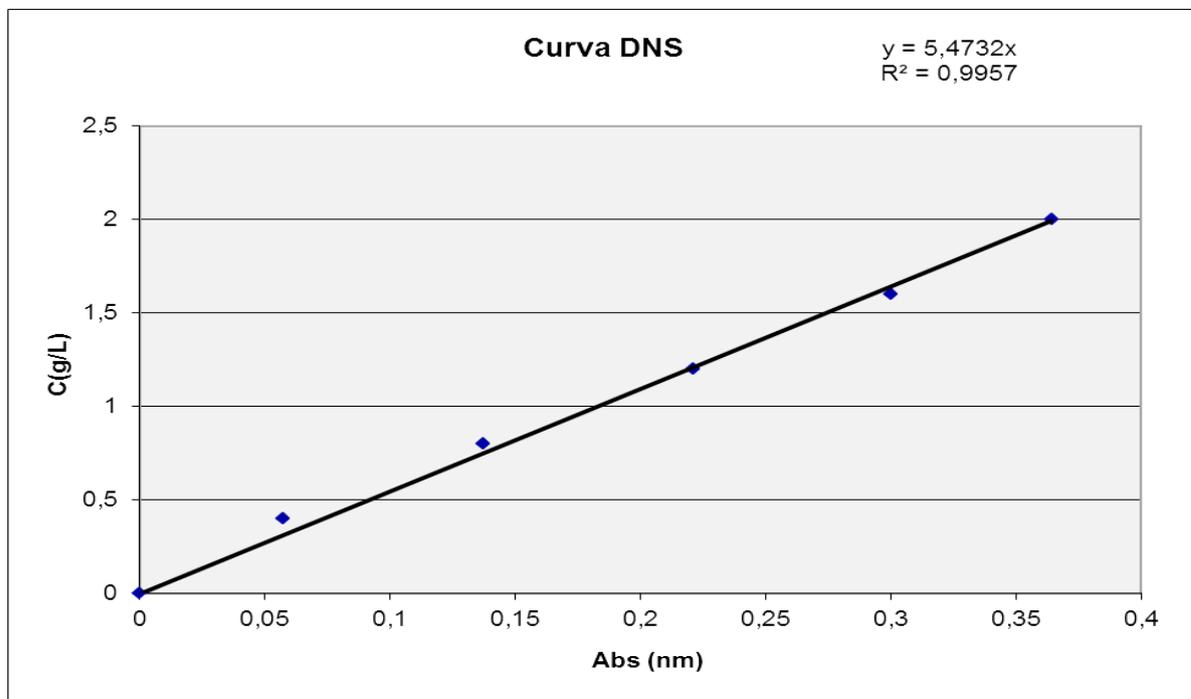
Para o procedimento da análise de açúcares redutores totais (ART), coletou-se 0,5 mL da amostra, sendo esta hidrolisada com 5 mL de H_2SO_4 (1,5 M) e levadas a banho fervente por 20 minutos em tubos de ensaios com tampa. Posteriormente as amostras foram resfriadas e neutralizadas com NaOH (40%) utilizando fenolftaleína (1%) como indicador, até a coloração rosa. Em seguida adicionaram-se gotas de H_2SO_4 (1,5 M) para voltar à coloração transparente. Logo após, as amostras foram homogeneizadas e transferidas para proveta, fazendo-se diluição. Coletou-se, então, 0,25 mL dessa amostra diluída, juntamente com 0,5 mL de água destilada e 0,25 mL de DNS em tubos de ensaio com tampa, colocando em banho fervente por 5 minutos. Posteriormente, as amostras são resfriadas e adiciona-se 4 mL de água destilada. Faz-se então a leitura de absorbância em 540nm no espectrofotômetro. O valor de ART é obtido através da Equação 2.

$$\text{ART (g/L)} = \text{fator de diluição} \times \text{absorbância} \times \text{fator DNS} \quad (2)$$

Para a preparação do reagente DNS pesou-se 5g de DNS em 100 mL de solução de NaOH 2M aquecendo em banho a 40°C para dissolver o DNS. Em seguida, adicionou-se 150g de tartarato duplo de sódio e potássio (sal de *Rochelle*) completando-se com água destilada para 500 mL. A solução foi armazenada em frasco escuro e mantida refrigerada.

Para a quantificação dos açúcares em ART, construiu-se uma curva padrão de glicose versus absorbância, onde inicialmente preparou-se uma solução mãe de glicose de 2,0 g/L. Posteriormente, foram realizadas diferentes diluições (0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0) g/L e leu-se em espectrofotômetro a 540nm. A partir da equação da reta, obtiveram-se os valores de glicose de cada amostra e o fator do DNS ($y = 5,4732 x$), como apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Curva do fator de DNS



Fonte: Acervo do autor, 2015.

4.4 Estudo da fermentação do caldo hidrolítico dos resíduos de milho

4.4.1 Microrganismo empregado na fermentação

A fermentação foi realizada utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* na forma de fermento biológico comercial, cultivada em meio de cultivo líquido YPD (*Yeast Peptone Dextrose*).

4.4.2 Preparo do inóculo e do meio de fermentação

Para o preparo do meio de crescimento foi utilizado o meio de cultura YPD (10g/L de extrato de levedura, 20g/L de peptona e 20g/L de glicose) devidamente esterilizado, adicionando 1g do fermento comercial em *shaker* a 30°C, com agitação de 100rpm por 48hs.

Para o preparo do meio de fermentação, após crescimento, as células foram centrifugadas a 2000rpm por 15min, descartando o sobrenadante. O mesmo procedimento de centrifugação foi realizado para a lavagem das células com água estéril, eliminando possíveis resíduos do meio de cultura. As células foram inoculadas a 20mL do hidrolisado esterilizado e suplementado com solução de nutrientes.

4.4.3 Processo fermentativo

Os experimentos de fermentação foram conduzidos em *shaker* 30°C com agitação de 200rpm por 24hs.

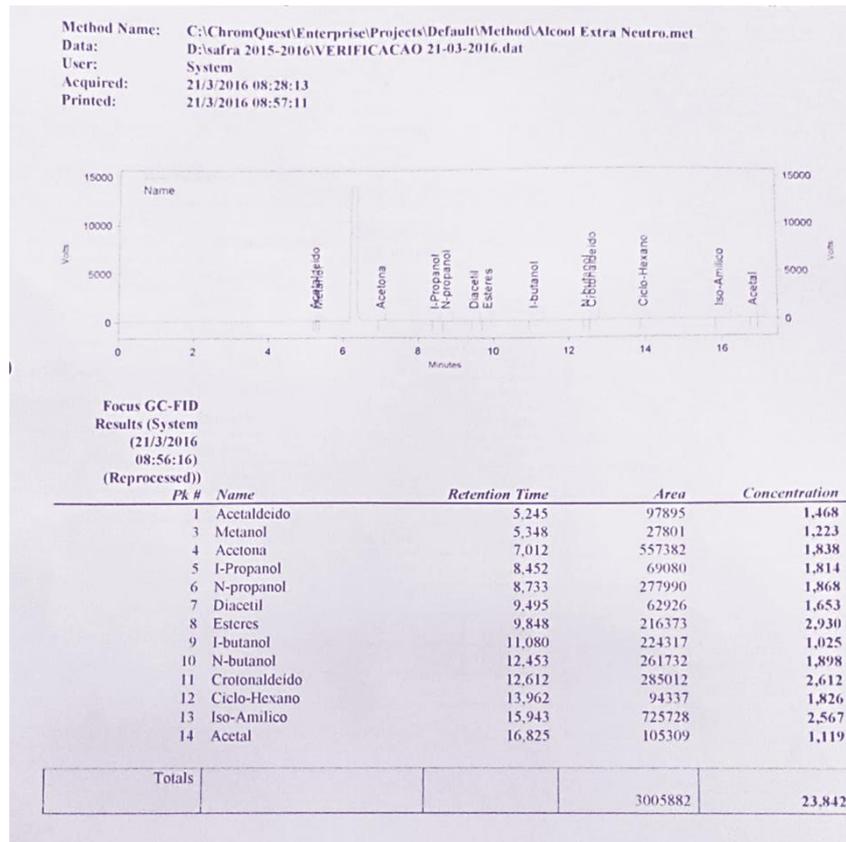
Ao final da fermentação, a formação de glicerol foi determinada por Cromatografia Líquida/HPLC (coluna SC 1011), fase móvel água ultra pura (*Millipore*), vazão de 1mL/min, temperatura do forno a 80°C e detector IR (índice de refração), marca *Shimadzu*.

4.4.4 Processo de destilação

Para o processo de destilação, foram coletados 5mL do vinho fermentado e levado ao aparelho de destilação fracionada de bancada em laboratório. Após destilação, foi recolhido 5mL do destilado e colocado em balão de 50mL. Em seguida foi retirado 2mL desta solução e colocado em tubo de ensaio juntamente com 2mL de solução de dicromato de potássio, levado ao banho-maria por 30min a 60°C. Posteriormente, à temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 600nm de comprimento de onda.

Para a determinação da qualidade e especificação do álcool produzido foi utilizado cromatógrafo gasoso modelo *Focus GC da Thermo scientific* com fase móvel gasosa constituída por ar sintético, nitrogênio e hidrogênio (*White Martins*), onde a temperatura do forno variava de 60 a 110°C. Para tanto, foi realizada inicialmente uma análise (injeção de calibração) para verificação do método e assegurar que o equipamento está devidamente calibrado, como mostra a Figura 15:

Figura 15 - Cromatograma de verificação de calibração de cromatógrafo GC.



Fonte: Acervo do autor, 2016.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Determinação de umidade dos resíduos de milho *In natura*.

Na Tabela 6, é apresentado o teor de umidade, determinado mediante metodologia descrita anteriormente.

Tabela 6 - Teor de umidade da palha e do sabugo de milho *in natura*.

Material <i>In natura</i>	1^a	2^a	3^a	4^a	Média
Palha	8,30	8,68	8,44	8,55	8,49 ± 0,12
Sabugo	6,20	6,47	6,80	6,83	6,58 ± 0,24

Fonte: Acervo do autor, 2016.

Foram realizadas quatro determinações, as quais permaneceram constantes, indicando que os resíduos estão livres de umidade. O teor de umidade apresentado está relacionado ao fato das amostras se encontrarem *in natura*, mas é considerado aceitável visto que são valores menores que 10%. Valores acima deste pode acarretar contaminação biológica, como o desenvolvimento de bactérias que produzem substâncias indesejáveis (MENEGUETTI et al., 2010).

Os valores encontrados nesse trabalho estão de acordo com a literatura, pois estudos realizados por Vieira et al. (2014) sobre a umidade dos resíduos de milho *in natura* demonstraram 6,76% e 6,87% para o sabugo e palha de milho, respectivamente.

5.2 Rendimento mássico após pré-tratamento

Os valores dos rendimentos mássicos da fração sólida do pré-tratamento são apresentados na Tabela 7 e determinados em duplicata de acordo com o procedimento e equação já descritos anteriormente.

Tabela 7 - Rendimento mássico obtido após pré-tratamento

Tipo de biomassa	Rendimento (%)		
	1°	2°	Média
Palha	74,20	73,80	74,10 ± 0,28
Sabugo	73,70	72,80	73,25 ± 0,64

Fonte: Acervo do autor, 2016.

Em termos de rendimento mássico para ambas as biomassas os resultados foram satisfatórios, indicando assim que o pré-tratamento empregado foi efetivo.

Santos (2014) também estudou pré-tratamento em resíduos de milho com H₂SO₄ 0,5% à 120°C por 15 minutos obtendo resultados para o rendimento de 46,7% e 46,5% para a palha e sabugo de milho, respectivamente.

Carli (2011) reportou em seus estudos rendimentos mássicos para bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado de várias formas, onde o menor valor foi de 35% para bagaço *in natura* explodido autoclavado com solução de H₂SO₄ 1% seguido de autoclavagem com solução de NaOH 4% e o maior valor foi de 59% para bagaço explodido autoclavado com água.

Antunes et al. (2014) obteve rendimentos mássicos para dois tipos de palma, ambas pré-tratadas com solução de H₂SO₄ 0,5% por 15 minutos, onde os resultados foram 59,66% e 61% para *Nopalea* e *Opuntia*, respectivamente. Em outro estudo, Antunes et al (2014) utilizou albedo de laranja para pré-tratamento com diferentes ácidos, encontrando o melhor resultado também com H₂SO₄ 0,5% à 120°C por 15 minutos obtendo resultado de 49,66% em rendimento mássico.

5.3 Matriz de planejamento da hidrólise enzimática

Os efeitos e níveis foram organizados numa matriz de planejamento 2³ juntamente com a combinação dos efeitos e sua correspondente resposta, como ilustrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Matriz de planejamento com duplicata para ambas as biomassas

ensaio	efeito 1	efeito 2	efeito 3	Resposta ART (g/L)		Média
1	-	-	-	7,80	7,90	7,85
2	+	-	-	16,53	21,11	18,82
3	-	+	-	8,32	8,01	8,17
4	+	+	-	24,96	17,26	21,11
5	-	-	+	9,57	9,57	9,57
6	+	-	+	27,66	28,28	27,97
7	-	+	+	11,64	8,42	10,03
8	+	+	+	30,57	30,78	30,68

Fonte: Acervo do autor, 2016.

onde, efeito 1 é a carga de sólidos (g), efeito 2 é o tempo de hidrólise (h) e efeito 3 é a biomassa (tipo).

Observando a Tabela 8, a melhor condição em termos de ART foi o ensaio 8, com 30,68 g/L usando-se 5g de palha durante 48h de hidrólise. Porém, houve mais três ensaios (2, 4 e 6) com resultados promissores que devem ser levados em consideração, podendo ser posteriormente fermentados. Esse fato reforça a importância da carga de sólidos utilizada que corresponde ao efeito mais significativo.

O ensaio 8 que apresentou, além do melhor resultado de todo o planejamento, também a melhor condição para a palha. No entanto, o ensaio 6 apresentou ART aproximadamente 10% menor, mas utilizando a metade do tempo do ensaio 8. Isto significa que talvez não seja viável manter uma hidrólise por mais tempo devido ao consumo de energia, insumos e serviços, uma vez que o tempo não se mostrou significativo na faixa investigada. Outra condição promissora foi apresentada pelo sabugo com o ensaio 4, obtendo-se 21,11g/L de ART. Similarmente à palha, o sabugo apresentou uma segunda condição (ensaio 2) com ART aproximadamente 12% menor, mas também com a metade do tempo.

Apesar do ensaio 8 ter sido a melhor condição (resposta em ART) dos experimentos, vale salientar que o mesmo contém 5 vezes mais carga de sólidos do que, por exemplo, o ensaio 7 sob as mesmas condições de tempo e tipo de biomassa. Porém foi obtido apenas, aproximadamente, 3 vezes mais em termos de ART como resposta.

Silva (2011) empregou bagaço de cana-de-açúcar *In natura* pré-tratado com NH₄OH 10% para hidrólise enzimática com 3% de carga de sólidos (3g bagaço: 100mL de solução), obtendo conversão em glicose de 64,2%. Em seguida, aumentou a carga de sólidos para 5% obtendo conversão em glicose de 69,7%. Houve um aumento da carga de sólidos de 66,67%, porém o aumento na conversão em glicose foi apenas de 8,57%.

Para o mesmo autor, em seus estudos realizou hidrólise enzimática empregando bagaço de cana-de-açúcar explodido pré-tratado com NH_4OH 15% a 50°C por 60min com 1% de carga de sólidos (1g bagaço: 100mL de solução), onde a solução continha 60mL de tampão citrato pH 4,8 (50mM), 40mL de água destilada em *shaker* a 50°C com agitação de 150 rpm por 72 horas, obtendo-se concentração de glicose de 3,8g/L.

Os valores de ART obtidos neste trabalho foram melhores do que os estudos de Santos (2014), no qual foi utilizado 1 g de biomassa (palha e sabugo de milho) pré-tratados com 0,5% de H_2SO_4 à 120°C por 15 minutos para hidrolisar com 2mL de enzima comercial Accellerase 1500 à 50°C , 150rpm por 72hs obtendo concentração de ART no hidrolisado de 19,6g/L e 6,1g/L para a palha e sabugo, respectivamente.

Os resíduos de milho mostraram-se mais promissores do que os resultados de Gomes (2015) para o bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço foi pré-tratado com 0,5% de H_2SO_4 à 120°C por 15 minutos e para o processo de hidrólise usou 1g de bagaço e 1mL de enzima comercial Cellic Ctec2 à 50°C , 150rpm por 72hs obtendo 13,70g/L de ART.

Gonçalves et al. (2013), reportou em seu trabalho que as hidrólises enzimáticas apresentaram conversões dos materiais lignocelulósicos em glicose entre 75 a 85%, utilizando o kit enzimático Cellic CTec 2 e HTec 2 .

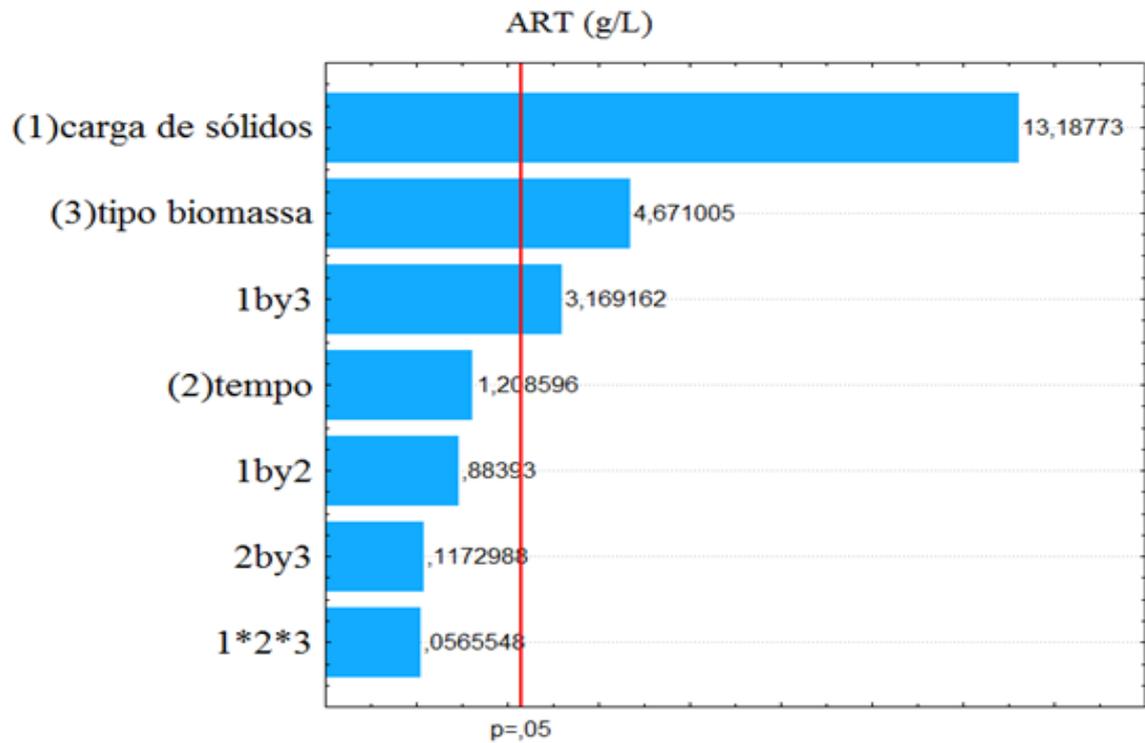
Vieira et al. (2014), utilizou em seus trabalhos 1g de resíduos de milho pré-tratados com H_2SO_4 0,5% por 15 minutos a 120°C em hidrólise enzimática, onde a melhor condição encontrada para os dois resíduos foi em 48 horas de hidrólise e 1 mL de enzima comercial celulase de *Aspergillus niger*, obtendo 0,14g de AR/g de palha hidrolisada e 0,07g de AR/g de sabugo.

Carli (2011) realizou experimentos de hidrólise enzimática na configuração SHF a 50°C , sob agitação de 150rpm empregando diferentes cargas de sólidos pré-tratadas explodidas a vapor e diferentes cargas enzimáticas, onde as realizadas com maior carga de sólido (20%) apresentaram um hidrolisado mais concentrado em glicose, obtendo-se em 34 horas conversão na ordem de 64%.

5.3.1 Análise de variância do modelo estatístico

É possível observar na Figura 16, que dois efeitos principais foram significativos, destacando-se a carga de sólidos como o mais significativo, uma vez que em maiores quantidades de biomassa implica numa maior liberação de açúcares.

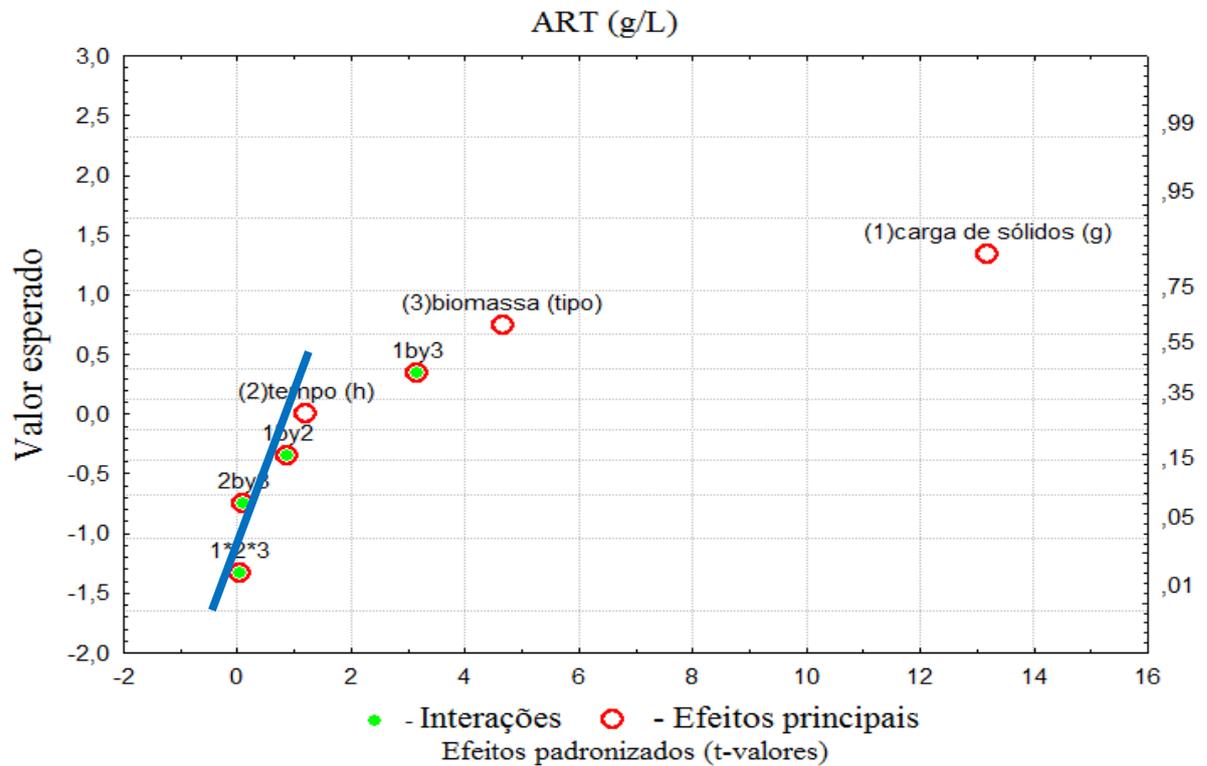
Figura 16 – Gráfico de Pareto



Fonte: Acervo do autor, 2106.

O outro efeito significativo foi o tipo de biomassa, onde a palha corresponde melhor aos experimentos para a faixa estudada, talvez por ela *in natura* já se apresentar mais rica que o sabugo com 36,7% de celulose e 34,2% de hemicelulose enquanto o sabugo possui 35,4% de celulose e 26,9% de hemicelulose, aliada ao pré-tratamento que se mostrou efetivo (Santos, 2014), que também pode ser observado na Figura 17, comprovando o que o Gráfico de Pareto afirma.

Figura 17 - Gráfico de probabilidade



Fonte: Acervo do autor, 2016.

Para o tratamento das respostas, foi utilizada equação do modelo linear e com interação para os cálculos dos parâmetros estatísticos para verificar se o modelo aplicado é adequado ao sistema, como mostra a Equação 3.

$$y(x_1, x_2, x_3) = 16,77 + 7,87x_1 + 2,79x_3 + 1,89x_1 x_3 \quad (3)$$

Dessa forma, foi necessária a construção da análise de variância, tabela ANOVA, proposta por Neto et al. (2001), apresentada na Tabela 9.

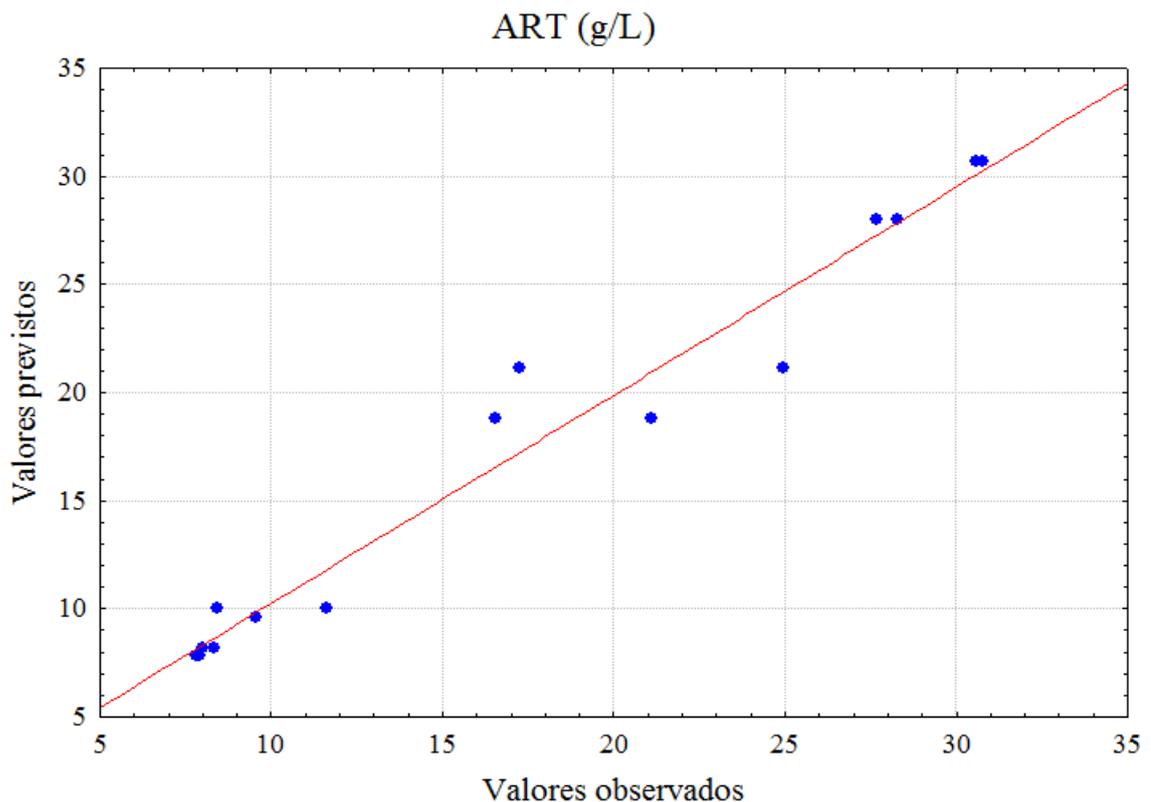
Tabela 9 – ANOVA para o modelo linear em ART

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº graus de liberdade	Média quadrática
regressão	1172,54	3	390,85
resíduos	58,46	12	4,87
falta de ajuste	12,87	4	3,22
erro puro	45,58	8	5,70
<hr/>			
% de variação explicada:	95,25		
% máxima de variação explicável:	96,30		

Fonte: Acervo do autor, 2016.

De acordo com os resultados da análise da variância da tabela ANOVA, é feito o teste F para julgar se o modelo escolhido representa bem as observações, ou se é preciso modificá-lo. O teste F é baseado nos graus de liberdade, onde a razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática do resíduo deve ser maior, se possível dez vezes mais, do que o ponto de distribuição F, com o propósito de obter um maior grau de confiabilidade. Assim, para esse sistema, $MQ_R/MQ_r = 80,23 > (10 \times F_{3,12})$; $F_{3,12} = 3,49$ para 95% de confiança. Outro teste F também é realizado, desta vez é a razão entre a média quadrática devido ao erro puro e a média quadrática devido à falta de ajuste deve ser menor do que o ponto de distribuição F. Logo, para esse sistema, $MQ_{faj}/MQ_{ep} = 0,56 < F_{4,8} = 3,84$ para 95% de confiança (NETO et al., 2001). Isto quer dizer que o modelo linear define um ajuste altamente significativo, portanto, desnecessário a procura por outro modelo, como apresentado na Figura 18.

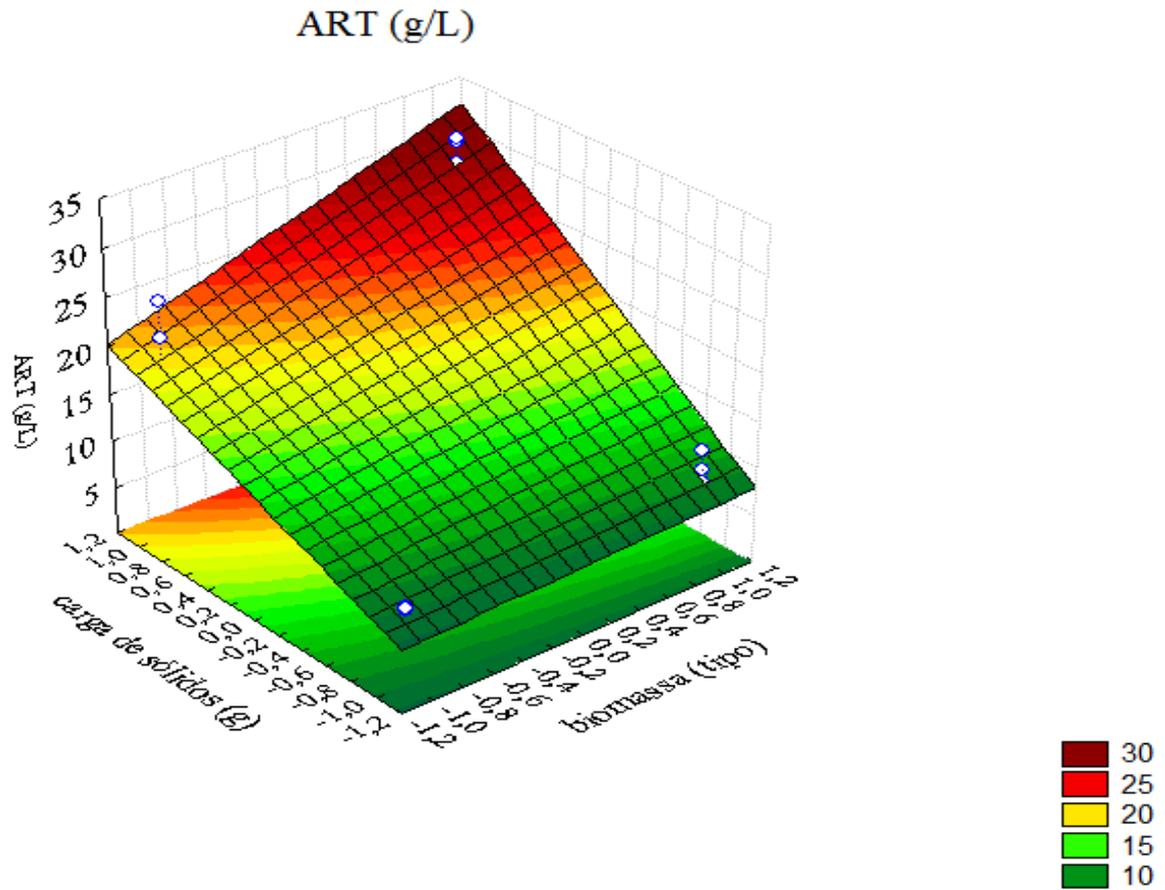
Figura 18 - Ajuste ao Modelo Linear



Fonte: Acervo do autor, 2016.

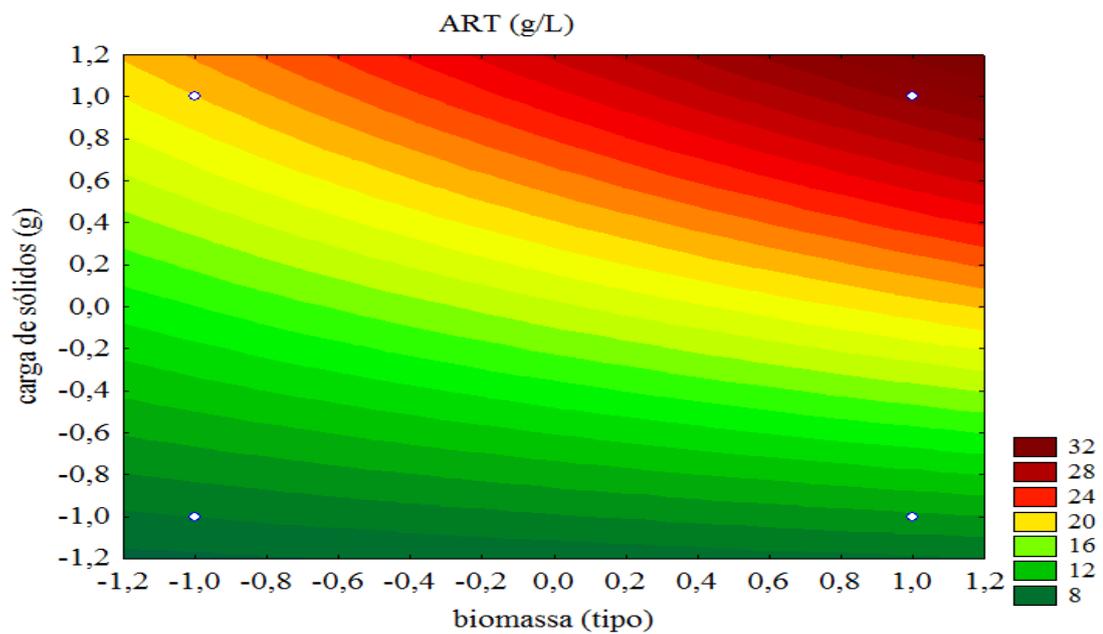
Através das superfícies de resposta produzidas pelo modelo linear, percebe-se que os maiores índices de ART (g/L), que é o ponto de interesse para a etapa subsequente de fermentação, são apresentados em níveis superiores de carga de sólidos e tipo de biomassa, como mostram as Figuras 19 e 20.

Figura 19 - Superfície de resposta em 3D



Fonte: Acervo do autor, 2016.

Figura 20 - Curvas de nível da resposta ART (g/L)

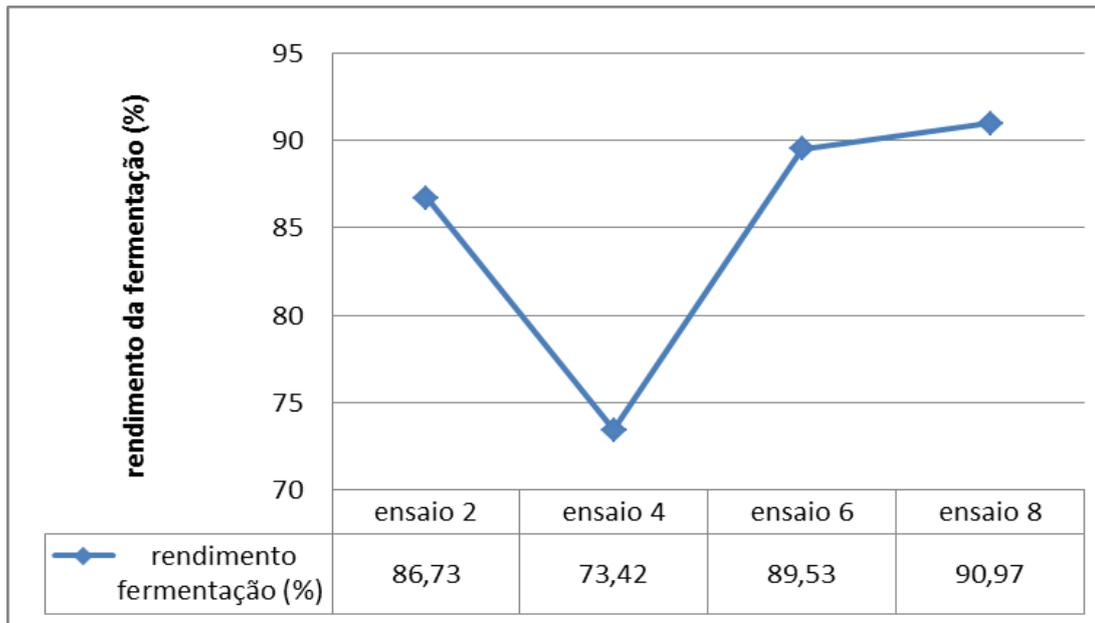


Fonte: Acervo do autor, 2016.

5.4 Fermentação e álcool produzido

De acordo com os dados apresentados na Figura 21, observa-se o maior rendimento de fermentação foi para o ensaio 8, com 90,97%.

Figura 21 - Dados da fermentação e produção de etanol



Fonte: Acervo do autor, 2016.

Os ensaios que apresentaram menores rendimentos de fermentação ocorreram, possivelmente devido à presença de inibidores, aspectos bioquímicos e das condições das variáveis de processo.

Carli (2011) reporta em seus estudos eficiência de fermentação de 94% para hidrolisado proveniente de bagaço de cana-de-açúcar in natura (20% de carga de sólidos) pré-tratado com H_2SO_4 1% e NaOH 7%.

Ferreira (2013) obteve em seus estudos 96% de eficiência de fermentação para hidrolisado proveniente de torta de dendê (*Elaeis guineenses*) pré-tratada com H_2SO_4 5% e NaOH 7%.

Silva (2011) realizou fermentação empregando caldo hidrolítico com concentração de glicose de 3,8g/L proveniente de bagaço de cana-de-açúcar explodido pré-tratado com NH_4OH 15%, obtendo-se eficiência de fermentação de 75,4%.

Caldos hidrolíticos provenientes de pré-tratamentos alcalinos apresentam maiores rendimentos em fermentação, hipótese associada à remoção de lignina, característico em pré-tratamentos com hidróxido de sódio (MOISER et al., 2005).

Silva (2015) obteve eficiência de fermentação de 77,15% utilizando como biomassa palma (*Nopalea cochenilifera*) pré-tratada hidrotermicamente.

Saini et al. (2015) realizaram estudos de hidrólise e de fermentação separados, a hidrólise enzimática foi realizada durante 72 h a 50°C utilizando diferentes cargas de sólidos (10, 15 e 20%, em peso). As amostras foram retiradas a cada 24 h para a estimativa de etanol e açúcares. Os rendimentos de etanol obtido durante SHF foram de 0,49 g de etanol por g de glicose.

Kahr et al. (2013) utilizaram 11,1% de palha de milho pré-tratada e hidrolisada com enzima Accellerase 1500 a 50 ° C durante 96 h numa incubadora com agitação. Para a fermentação utilizaram a levedura *Saccharomyces crevisiae* a 30°C por 168h, obtendo-se 40% do rendimento do processo de fermentação.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 10 , observa-se o maior teor alcoólico para o ensaio 8, com 3,9g/L de álcool produzido.

A menor taxa de álcool produzido foi apresentada pelo ensaio 4 com 3,0g/L, apesar de não ter apresentado o menor ART no caldo hidrolítico. Uma hipótese para esse fato é que nem todos os açúcares presentes foram convertidos em açúcares fermentescíveis.

Nos estudos apresentados por Silva (2014) empregando resíduos de processamento de frutas como biomassa, obteve álcool com valores que variaram entre 0,2 a 1,0g/L.

Tabela 10 - Produção de álcool e formação de glicerol

ensaio	álcool (g/L)	glicerol (g/L)
8	3,90	0,49
6	3,59	0,43
4	3,00	0,52
2	3,30	0,42

Fonte: Acervo do autor, 2016.

Além do álcool, na fermentação é produzido o glicerol, onde o maior valor foi para o ensaio 4 com 0,52g/L.

O glicerol é um subproduto da fermentação alcoólica e formação excessiva deste composto não é desejável, já que para a sua formação a levedura utiliza açúcar do meio de fermentação que poderia ser convertido em etanol (SALVATO, 2010).

5.5 Qualidade do álcool produzido

Os álcoois obtidos no processo de destilação em todos os ensaios se apresentaram isentos de contaminantes, portanto, dentro das especificações e padrões exigidos, como mostra a Tabela 11.

Tabela 11 - Padrão para álcool utilizando cromatografia gasosa

Componentes	Concentrações (mg/100mL)
aldeído acético	1,462
metanol	1,221
acetona	1,838
iso propanol	1,814
acetato de etila	2,930
n-propanol	1,868
iso butanol	1,025
n-butanol	1,898
diacetyl	1,653
crotonaldeído	2,612
ciclohexano	1,826
acetal	1,119
isoamílico	2,567

Fonte: Adaptada de PSA QUÍMICA, 2016.

Além da mistura de etanol puro com água, são toleradas nos combustíveis alguns minerais e outras substâncias, que só podem estar presentes em pequeníssimas quantidades. Uma delas é o metanol, composto altamente tóxico e sua presença pode ser no máximo 0,5% do volume total do álcool. Também é delimitada a presença de hidrocarbonetos no álcool a uma taxa de até 3% (NOVA CANA, 2016; ANP, 2016).

6 CONCLUSÕES

- ✓ Nos experimentos realizados de pré-tratamento, ambas as biomassas apresentaram elevado rendimento mássico. Esses resultados apontam preliminarmente para a potencialidade da utilização do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído no processo de produção de etanol celulósico;
- ✓ No processo de hidrólise enzimática, o pré-tratamento utilizado se mostrou bastante efetivo onde houve desassimilação enzimática para ambas as biomassas. Todavia, a palha alcançou maiores taxas de hidrólise que o sabugo, indicando que houve uma melhor desorganização de sua estrutura lignocelulósica;
- ✓ O planejamento experimental viabilizou o estudo das melhores condições de operação da hidrólise, através da observação dos efeitos e combinações dos parâmetros, onde os melhores índices de ART (g/L) foram para a palha de milho atrelado aos seus níveis superiores de biomassa e tempo, na faixa investigada;
- ✓ A fermentação dos hidrolisados foi realizada empregando a levedura *Saccharoyces cerevisiae* (linhagem comercial) que se mostrou adequada para a conversão dos açúcares. As eficiências de fermentação alcançaram valores acima de 73% para ambas as biomassas.
- ✓ Com base nos resultados apresentados, foi possível concluir que ambas as biomassas podem ser empregadas na linha de produção de etanol como fonte de celulose, visto que foram obtidos bons parâmetros em cada etapa do processo nas condições estudadas. Vale ressaltar que não houve nenhum tipo de processo de dextoxificação ou retirada de lignina do meio;
- ✓ Portanto, a produção de etanol a partir dos resíduos de milho se mostrou promissora, pois a cultura se apresenta economicamente importante para o Brasil, enriquecendo a matriz energética com fontes limpas e renováveis. Além disso, viabiliza o desenvolvimento do País, agregando valor a cultura do milho gerando emprego e renda.

7 SUGESTÕES PARA ETAPAS FUTURAS

- ✓ Estudos sobre a fermentação da fração hemicelulósica (constituída principalmente por pentoses) poderá incrementar a produção de etanol por tonelada de resíduos de milho;
- ✓ Promover a remoção da lignina para atingir melhor rendimento em etanol;
- ✓ Realizar experimentos de hidrólise com ponto central das variáveis no planejamento;
- ✓ Utilizar nos experimentos menores tempos de hidrólise, visto que o mesmo não se mostrou como efeito significativo para a faixa investigada.
- ✓ Fazer estudo comparativo de granulometria da biomassa e utilizar maiores cargas de sólidos, visto que foi o efeito mais significativo para a faixa investigada.

REFERÊNCIAS

ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Biocombustíveis no Brasil**, 2015. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Acesso em: 12 de Fevereiro de 2015.

ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Biocombustíveis no Brasil**, 2016. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Acesso em: 22 de Março de 2016.

ANTUNES, D. P. C., SANTOS, M. C. S., SOARES, E. L. S., BARBOSA, K. L., VIEIRA, R. C., VIANA, V. L., ALMEIDA, R. M. R. G. **Estudo do Pré-Tratamento Ácido da Palma Forrageira para a Produção de Etanol de Segunda Geração** In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis, SC, 2014.

ANTUNES, D. P. C., VIANA, V. L., SANTOS, M. C. S., SOARES, E. L. S., BARBOSA, K. L., MOURA, K. L., VIEIRA, R. C., ALMEIDA, R. M. R. G. **Produção de Bioetanol de Segunda Geração a Partir do Hidrolisado do Albedo da Laranja como Fonte de Biomassa Lignocelulósica**. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis, SC, 2014.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanolprocessing. Progress. In: **Energy and Combustion Science**. v. 34, n. 25, p. 551-553, 2008.

BAUDEL, H. M. **Pré-Tratamento e Hidrólise**. In: III Workshop tecnológico sobre Hidrólise para a produção de etanol. Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol, São Paulo - SP, 2006.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar**. Dissertação (Microbiologia Agrícola) - Universidade de São Paulo, 76f., 2011.

CABRAL, A. C., THEODOROVITZ, A. V., SOUZA, S. N. M., JUNIOR, A. M., CABRAL, C. Milho (*Zea mays*) uma cultura energética. **Acta Iguazu**. Cascavel, v1, n.4, p. 47-54, 2012.

CABRAL, M. M. S., **Aproveitamento da Casca do Coco para Produção de Etanol de Segunda Geração**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió – AL, 2015.

CARLI, C. M. **Hidrólise e Fermentação do Bagaço de Cana-de-Açúcar em Escala de Bancada para Produção de Etanol 2G**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2011.

CARVALHO, M. L. **Estudo Cinético da Hidrólise Enzimática de Celulose de Bagaço de Cana-de-Açúcar**. 2011. 102p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

CINELLI, B. A. **Produção de Etanol a partir da Fermentação Simultânea à Hidrólise do Amido Granular de Resíduo Agroindustrial**. 2012. 200p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

CORTEZ, L. A. B. Etanol: um produto estratégico para o Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de Cana-de-Açúcar: P & D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, Cap. 1, p. 3 – 16, 2010.

Disponível em <<http://www.agrocim.com.br>>. **Acesso em 20 de Janeiro de 2015.**

Disponível em <<http://www.canaldoprodutor.com.br>>. **Acesso em 08 de Janeiro de 2015.**

Disponível em <<http://www.iguiecolgia.com>>. **Acesso em 14 de Janeiro de 2016.**

Disponível em <<http://www.inovacao.unicamp.br/destaques/>>. **Acesso em 14 de Abril de 2014.**

Disponível em <<http://www.istoe.com.br>>. **Acesso em 05 de Março de 2016.**

Disponível em <<http://noticiasagricolas.com.br>>. **Acesso em 11 de Março de 2016.**

Disponível em <<http://novacana.com/etanol/control-qualidade>>. **Acesso em 26 de Março de 2016.**

Disponível em <http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2013/08/012-015_PesquisaFapesp-2013.pdf?94b408>. **Acesso em 05 de Março de 2015.**

FERREIRA, C. M. A. **Avaliação da Torta de Dendê (*Elaeis guineenses*) para Produção de Bioetanol de Segunda Geração.** 63p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal dos Vales de Jiquitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2013.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretratament of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. In: **Adv Biochem Engin/Bioethanol**, Springer Verlag Berlin Heidelberg, p. 41 – 65, 2007

GOMES, M. A. **Destoxificação de Hidrolisados Lignocelulósicos Visando à Obtenção de Etanol 2G.** 94p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió - Alagoas, 2015.

GONÇALVES, F. A., RUIZ, H. A., DOS SANTOS, E. S., TEIXEIRA, J. A., MACEDO, G. R. Hidrólise enzimática, sacarificação e fermentação simultânea de materiais lignocelulósicos usando *Saccharomyces cerevisiae* CA11. In: **XIX SINAFERM**, Foz do Iguaçu – PR, 2013.

GONÇALVES, F. A., SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J., FONSECA, G. G. Utilization of agro-industrial residues and municipal waste of plant origin for cellulosic ethanol production. **J. Environ. Protect**, v.2, p.1303-1309, 2011

HAMELINCK, C. N., HOOIJDONK, G. V., FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 384-410, 2005.

HINRICHS, R. A., KLEINBACH, M., REIS, L. B. **Energia e Meio Ambiente.** São Paulo: Cengage Learning. 4ª edição, Cap. 17, p. 623-656, 2010.

JANUÁRIO, J. P., AMARAL, L. C., BERTOLI, A. C. Utilização do sabugo de milho como adsorvente de um corante aniônico. In: **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.** Lavras – MG, 2009.

KAHR, H., WIMBERGERA, J., SCHURZA, D., JAGERA, A. Evaluation of the biomass potential for the production of lignocellulosic bioethanol from various agricultural residues in Austria and Worldwide. **Energy Procedia**. (40), p. 146 – 155, 2013.

KIM S.; HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1994 – 2006, 2005.

LANGAN, P., PETRIDIS, L., O'NEILL, M., PINGALI, S. V., FOSTON, M., NISHIYAMA, Y., SCHULZ, R., LINDNER, B., HANSON, B. L., HARTON, S., HELLER, W. T., URBAN, V., EVANS, B. R., GNANAKARAN, S., RAGAUSKAS, A., SMITHD, J. C., DAVISON, B. H. Common processes drive the thermochemical pretreatment of lignocellulosic biomass. **Green Chemistry**. (16), p. 63 – 68, 2014.

LANZMASTER, M. O poder do milho. **Canal do Produtor**. São Paulo - SP, 2014.

LORA, E. E. S., PALACIO, J. C. E., ROCHA, M. H., VENTURINI, O. J., BROCE, L. M. O futuro dos biocombustíveis: biorrefinarias e biocombustíveis a partir de algas e células microbianas. In: LORA, E. E. S., VENTURINI, O. J. **Biocombustíveis**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência. Cap. 16, p 1035, vol 2, 2012.

LUCIA, L. A. Lignocellulosic biomass: a potential feedstock to replace petroleum. **BioResources**. 3(4), p. 981-982, 2008.

MALDONADE, I. R., CARVALHO, P. G. B., FERREIRA, N. A. **Protocolo para Determinação de Açúcares Totais em Hortaliças pelo Método de DNS**. In: Comunicado Técnico Embrapa Hortaliças, Brasília – DF, 2013.

MELO, H., F. **Resposta ao Estresse Ácido em Leveduras da Fermentação Alcoólica Industrial**. Tese (Programa de Pós-Graduação de Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife – Pernambuco, 2006.

MELO, L. C. P., POPPE, M. K. Desafios da pesquisa, desenvolvimento e inovação em biocombustíveis no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de Cana-de-Açúcar: P & D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, Cap. 4, p. 27 – 33, 2010.

MENEGUETTI, C. C., MEZAROBA, S., GROFF, A. M. **Processos de Produção de Álcool Etilico de Cana-de-Açúcar e os Possíveis Reaproveitamentos dos Resíduos Resultantes**

do Sistema. In: IV Encontro de Engenharia de Produção Agroindustrial, Campo Mourão – PR, 2010.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.

Analytical Chemistry, v.31, p. 426-428, 1959.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Disponível em:
<<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>>. Acessado em: 05 de Abril de 2015.

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

NDIMBA, B. K., NDIMBA, R. J., JOHNSON, T. S., SIRISATTHA, W. R., BABA, M., SIRISATTHA, S., SHIRAIWA, Y., AGRAWALI, G. K., RAKWALI, R. Biofuels as a sustainable energy source: An update of the applications of proteomics in bioenergy crops and algae. **Journal of Proteomics**. (93), p. 234 – 244, 2013.

NETO, B. B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Campinas, SP: Editora UNICAMP, 2ª edição, p. 412, 2001.

NETO, T. L. S., TAKETOMI, Y. C., JUNIOR, R. C. O., OLIVEIRA, D. R., GALLO, J., TANABE, C. S., MARTINS, I. C., SILVA, A. D. Quantificação de restos culturais e concentração de nutrientes na cultura do milho no município de Belterra/PA. **Revista Espaço Científico**. Santarém – SP. v. 14, nº 1, 2013.

OETTERER, M., SARMENTO, S. B. S., REGITANO-D'ARCE, M. A. B., SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri, SP: Manole, 2006.

PAES, M. C. D., TEIXEIRA, F. F., MARTINS, I. S. **Composição Química da Palha de Milho com Qualidade para Artesanato**. Disponível em:
<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/30081/1/Composição-quimica.pdf>>
Acessado em: 05 de Março de 2015.

PALACIO, J. C. E., LORA, E. E. S., VENTURINI, O. J., OLMO, O. A. Biocombustíveis, meio ambiente, tecnologia e segurança. In: LORA, E. E. S., VENTURINI, O. J. **Biocombustíveis**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência. Cap. 1, p 2 - 46, vol 1, 2012.

PASCHOALINI, G., ALCARDE, V. E. Estudo do processo fermentativo de usina sucroalcooleira e proposta para sua otimização. **Revista de Ciência & Tecnologia**. Cap. 32, p 59 – 68, vol 16, 2009.

PERDICES, M. B., ARCAJA, G. E. A., CORAL, D. S. O., MENDOZA, M. A. G., NUNES, D. C. L. Bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos pela rota da hidrólise. In: LORA, E. E. S., VENTURINI, O. J. **Biocombustíveis**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência. Cap. 8, p 536 - 588, vol 1, 2012.

PEREIRA JR, N. Biorrefinarias: rota bioquímica. In: **Química Verde no Brasil: 2010-2030**. Brasília: Centro de Gestão de Estudos Estratégicos (CGEE). Cap. 1, p 19 – 75, 2010.

PEREIRA, R. C. **Relação entre Características Estruturais e Bioquímicas e a Textura do Grão de Milho**. 2006. 62p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, MG, 2006.

RABELO, S. C., COSTA, A. C., ROSSEL, C. E. V. Aproveitamento de resíduos industriais. In: SANTOS, F., BORÉM, A., CALDAS, C. **Bioenergia, Açúcar e Álcool: tecnologias e perspectivas**. Viçosa – MG. Cap 17, p 465 – 486, 2010.

REIJNDERS, L. Transport biofuel yields from food and lignocellulosic C4 crops. **Biomass and Bioenergy**, 34, p. 152-155, 2010.

ROCHA, M. H., NETO, A. E., SALOMON, K. R., LORA, E. E. S., VENTURINI, O. J., OLMO, O. A., RAMBLA, M. A. O. Resíduos da produção de biocombustíveis: vinhaça e glicerina. In: LORA, E. E. S., VENTURINI, O. J. **Biocombustíveis**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência. Cap. 12, p 692 - 809, vol 2, 2012.

ROSILLO-CALLE, F. Alimentos *versus* combustíveis: podemos evitar o conflito? In: CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de Cana-de-Açúcar: P & D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, Cap. 11, p. 101 – 114, 2010.

SAINI, J. K., AGRAWAL, R., SATLEWAL, A., SAINI, R., GRUPTA, R., MATHUR, A., TULI, D. Second generation bioethanol production at high gravity of pilot-scale pretreated wheat straw employing newly isolated thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DBTIOC-35. **RSC Advances**, (5), p. 37485 – 37494, 2015.

SAHA, C. B. L.; ITEN, L. B; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, n. 40, p. 3693–3700, 2005.

SALVATO, F. **Fermentação de Mosto Industrial por Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com Transportador de Sacarose e Sobreexpressão de Invertase Interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa**. 93p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de São Paulo/Luiz de Queiroz, Piracicaba – São Paulo, 2010.

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

SANTOS, M. S. R. **Estudo de Pré-Tratamentos de Palha e Sabugo de Milho Visando a Produção de Etanol 2G**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió - Alagoas, 2014.

SILVA, C. E. F. **Avaliação do Potencial de uso de Resíduos do Processamento de Frutas na Produção de Etanol 2G**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió - Alagoas, 2014.

SILVA, F. V. Panorama e perspectivas do etanol lignocelulósico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v.13, n. 20, p.01 – XX, jul./dez. 2012.

SILVA, G. M. **Pré-tratamento do Bagaço de Cana de Açúcar com Amônia Aquosa para Produção de Etanol**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – São Paulo, 2011.

SILVA JR, J. M. Água e agronegócio. **Canal do Produtor**. São Paulo – SP, 2015.

SILVA, M. C. S. **Avaliar a Capacidade de Produção de Etanol de Segunda Geração a partir da Variedade da Palma *Nopalea cochenilifera***. Dissertação (Pós-Graduação em Energia da Biomassa) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió - Alagoas, 2015.

SILVA, N. L. C. **Produção de Bioetanol de Segunda Geração a partir de Biomassa Residual da Indústria de Celulose**. Dissertação (Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of sugars, byproducts and degradation products in liquid fraction process samples. **Technical Report**, 2008.

TAHERZADEH, M. J., KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, 2(4), p.707-738, 2007.

VASCONCELOS, J. N. Fermentação etanólica. In: SANTOS, F., BORÉM, A., CALDAS, C. **Bioenergia, Açúcar e Álcool: tecnologias e perspectivas**. Viçosa – MG. Cap 15, p 401 – 437, 2010.

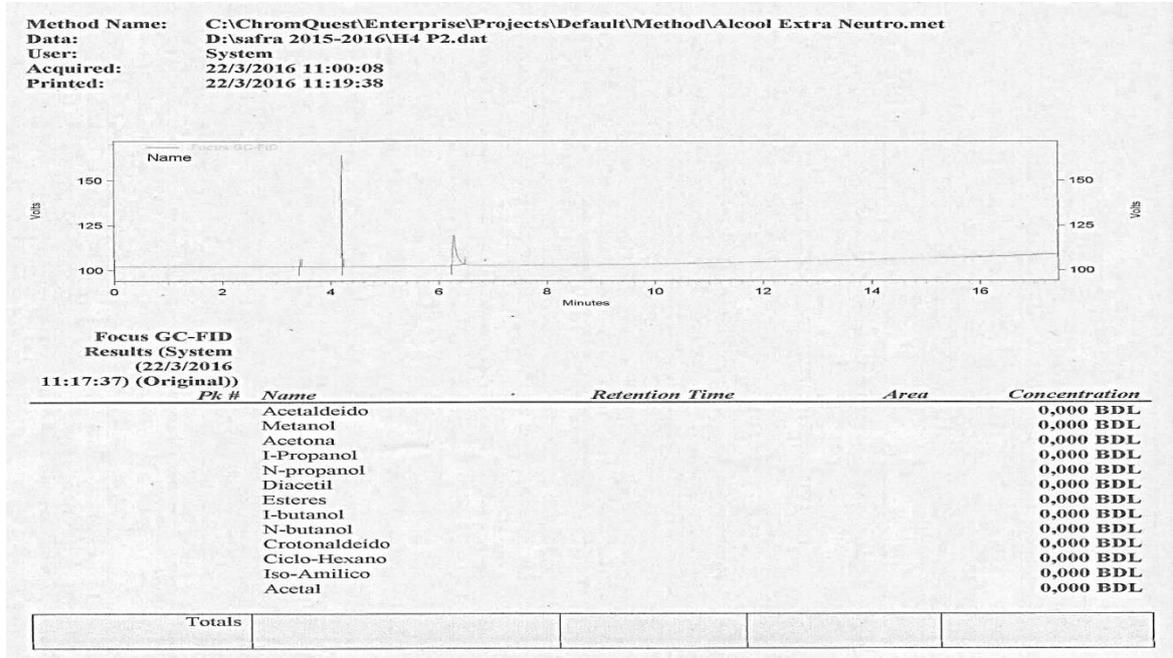
VIEIRA, R. C., ANTUNES, D. P. C., SILVA, M. C. S., ALMEIDA, R. M. R. G. **Estudo do Processo de Hidrólise de Resíduos Lignocelulósicos do Milho para a Produção de Bioetanol**. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis, SC, 2014.

ZHOU, C. H., XIA, X., LIN, C. X., TONGA, D. S., BELTRAMINIB, J. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels. **Chen Soc Rev**. p 5588 – 5617, 2011.

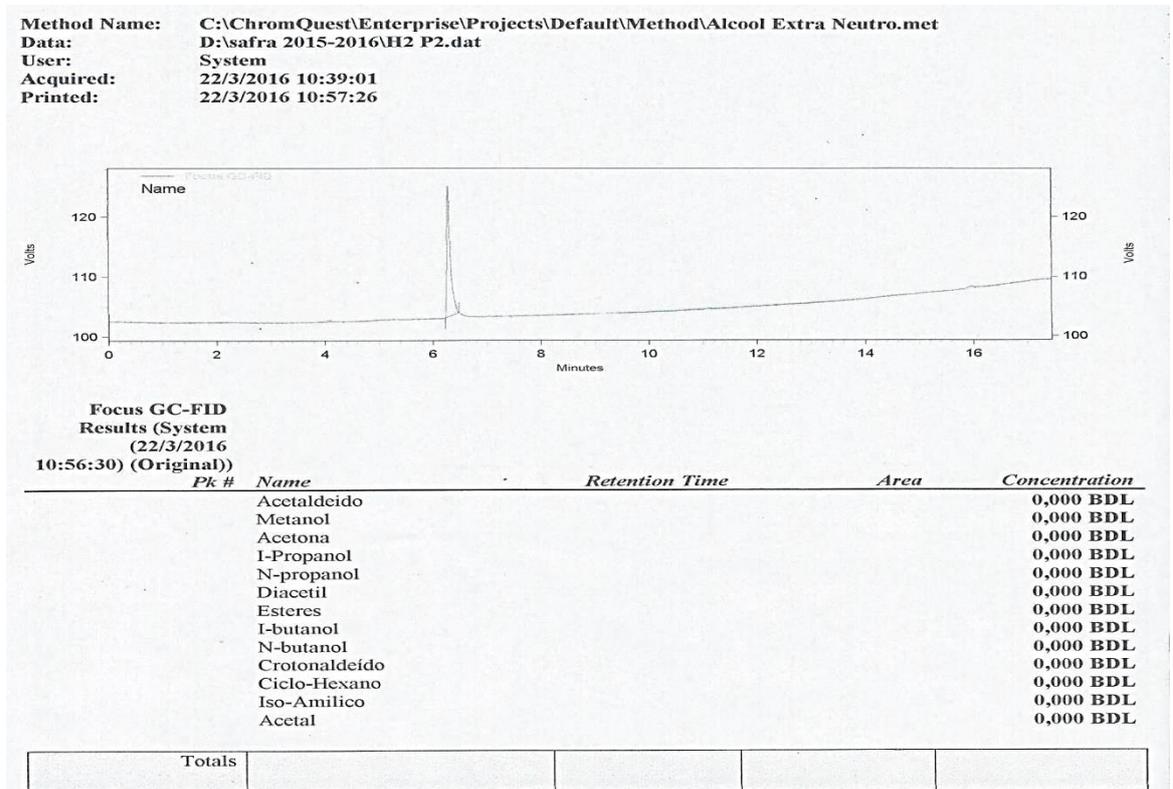
YOO, C. G., LEE, C. W., KIM, T. H. Optimization of two-stage fractionation process for lignocellulosic biomass using response surface methodology (RSM). **Biomass and Bioenergy**. (35), p. 4901 – 4909, 2011.

APÊNDICE

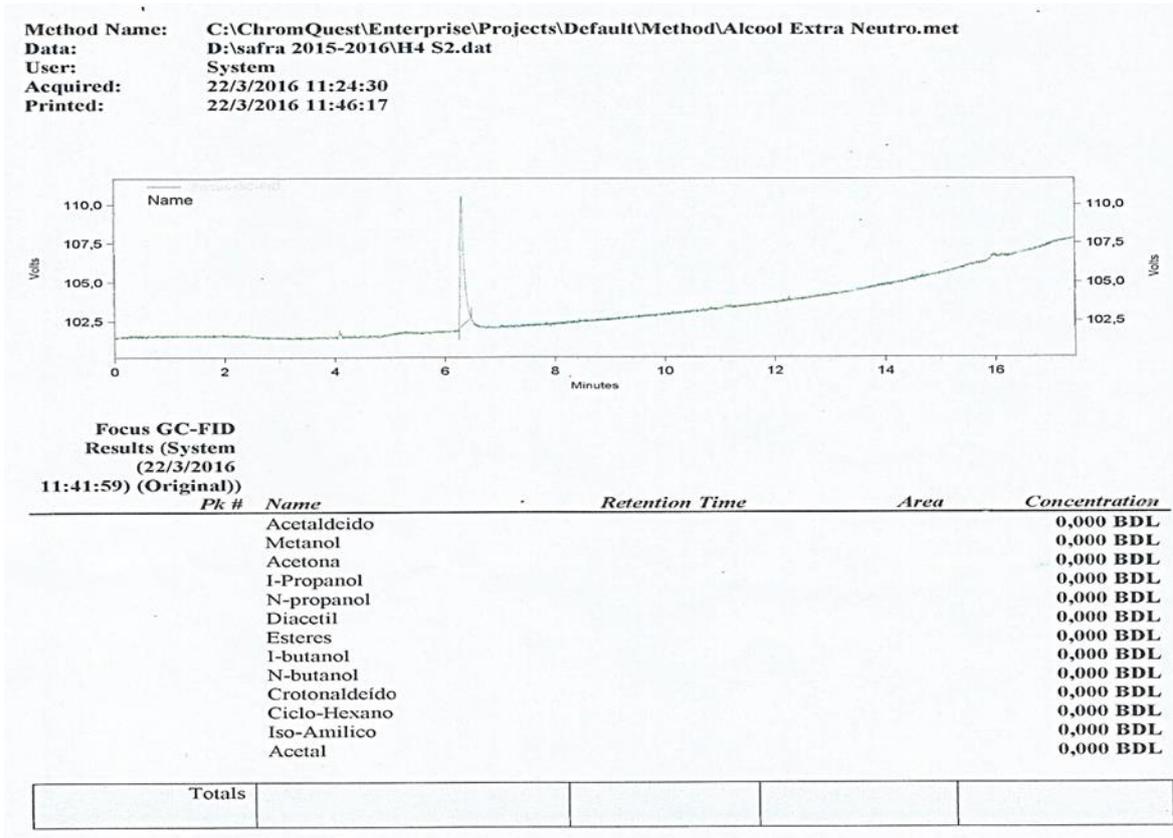
Apêndice 1: Cromatograma do álcool produzido no ensaio 8.



Apêndice 2: Cromatograma do álcool produzido no ensaio 6.



Apêndice 3: Cromatograma do álcool produzido no ensaio 4.



Apêndice 4: Cromatograma do álcool produzido no ensaio 2.

