



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS



POTENCIALIDADE DE OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FIBRA
DO SISAL

DOUGLAS ALEXANDRE SARAIVA LEÃO

Campina Grande – Paraíba

AGOSTO – 2014

**POTENCIALIDADE DE OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA
FIBRA DO SISAL**

DOUGLAS ALEXANDRE SARAIVA LEÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Processos.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Processos Fermentativos

ORIENTADORAS:

Profa. D.Sc. Marta Maria da Conceição

Profa. D.Sc. Líbia de Souza Conrado

Campina Grande – Paraíba

AGOSTO – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

L437p Leão, Douglas Alexandre Saraiva.
Potencialidade de obtenção de etanol a partir da fibra do sisal / Douglas Alexandre Saraiva Leão. – Campina Grande, 2014.
93 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2014.

"Orientação: Prof.^a Dr.^a Marta Maria da Conceição, Prof.^a Dr.^a Lúbia de Souza Conrado".

Referências.

1. Hidrólise. 2. *Agave sisalana*. 3. Bioetanol. I. Conceição, Marta Maria da. II. Conrado, Lúbia de. III. Título.

CDU 66.094.941(043)

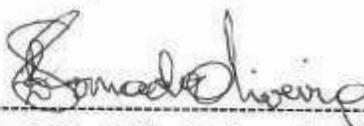
MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE
DOUGLAS ALEXANDRE SARAIVA LEÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS DO CENTRO DE CIÊNCIA
E TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

Tese de Doutorado Aprovada em: 29 de Agosto de 2014

TESE AVALIADA EM: ___ / ___ /2014 NOTA: _____



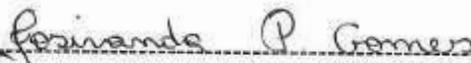
Prof. D.Sc. Marta Maria da Conceição (UFPB)
(Orientadora)



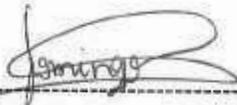
Prof. D.Sc. Líbia de Souza Conrado (UFCG)
(Orientadora)



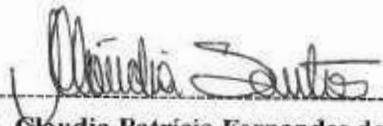
Prof. D.Sc. Crislene Rodrigues da Silva Moraes (UFCG)
Examinadora Interna



Prof. D.Sc. Josivanda Palmeira Gomes (UFCG)
Examinadora Interna



Prof. D.Sc. Denise Domingos da Silva (UFCG)
Examinadora Externa



Prof. D.Sc. Claudia Patricia Fernandes dos Santos (UFCG)
Examinadora Externa

Campina Grande, Agosto de 2014

Ao meu irmão André (in memoriam) saiba que relembrar as alegrias que você gerou entre nós é como se você aqui estivesse presente.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar o meu caminho, dando-me forças, coragem, prudência, paciência e discernimento para chegar a esta nova etapa de minha vida.

Aos meus pais, João Saraiva e Marly Rosa, pelo amor e apoio.

A minha esposa Nikanora meus filhos Yuri, Gabriel e Rebeca pela paciência e amor a mim dedicado, vocês são meus pilares de sustentação e aconchego.

Ao meu irmão Júnior, pelo incentivo.

As minhas orientadoras, Dra. Marta Maria da Conceição e Dra. Líbia de Sousa Conrado, que sempre estiveram presentes me dando força, que me mostraram o real papel de ser Professor, além de Professoras amigas e companheiras as quais passaram a ser modelo nessa nova etapa da minha vida.

Aos grandes amigos que fazem parte do LEB (Laboratório de Engenharia Bioquímica), Beatriz, Rebeca (a loira), Deivid, Bruno, Paloma, Renam, Isabelle, Clebsom, Neto, Alberto, Angela Santiago, Rapha, Ligia, Mithisua, Patrícia, Clotildes enfim a todos que nunca mediram esforços para me ajudar e realizar este sonho.

Aos amigos Daniel Sales, Wolia Costa, Shâmia Cabral que sempre estiveram presentes me dando apoio.

A minha amiga irmã Valdefran Maia Diniz, pelo apoio incondicional.

Aos Professores Flávio Luiz Honorato, Josivanda Palmeira, Crislene Moraes, sempre muito prestativos.

Aos Técnicos Jardes Caiçara e José Lopes, sempre muito atenciosos.

A Universidade Federal de Campina Grande, em especial a Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão pela liberação das minhas atividades para conclusão dos meus estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, em especial ao Coordenador Professor Dr. Antonio Gilson Barbosa de Lima.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADO!

Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

A matriz energética brasileira é uma das mais limpas do mundo e, atualmente, mais de 45% de toda energia consumida no país provém de fontes renováveis. O álcool é um combustível que já tem o seu lugar assegurado nessa matriz, diante disso, o etanol de segunda geração pode se tornar uma fonte de energia para o Brasil e o mundo. Uma planta promissora na produção de bioetanol é o sisal, pois possui 90 % de açúcares fermentáveis e 10 % a mais de celulose que a cana-de-açúcar, além disso, o Brasil é o maior produtor de sisal do mundo. O objetivo do trabalho foi caracterizar a fibra do sisal, quanto à concentração de açúcares por CLAE e a composição físico-química e térmica por meio de métodos convencionais e das técnicas de DRX, TG, DSC e MEV; determinar as melhores condições para o pré-tratamento ácido seguido de básico e realizar a hidrólise ácida e enzimática. Além de fermentar o licor hidrolisado de maior concentração de glicose. Para avaliar o pré-tratamento e a hidrólise ácida, usou-se duas granulometrias 0,21 e 0,49 mm da fibra e verificou-se os efeitos da temperatura e concentração de ácido na produção da xilose e glicose, utilizando como ferramenta um planejamento experimental fatorial. Para avaliar a hidrólise enzimática, verificou-se, por meio da aplicação de um planejamento experimental fatorial, o efeito da carga enzimática e a razão massa seca de fibra de sisal e extrato enzimático. Foram usadas as enzimas comerciais Celluclast 1.5L da Novozyme e beta-glicosidase da Proenzyme. O pré-tratamento ácido seguido de básico mostrou-se bastante eficiente em concentrar a celulose, pela retirada da hemicelulose e lignina, provocando um aumento da celulose de 54 para 83%. Evidenciou-se a cristalinidade da fibra de sisal, comprovada por Difração de Raios X, modificou-se a morfologia da fibra, verificada por Microscopia Eletrônica de Varredura, e, por meio da Termogravimetria e Calorimetria Exploratória Diferencial comprovou-se a degradação da hemicelulose e lignina. Com o material pré-tratado, o processo de hidrólise enzimática foi mais eficiente na sacarificação, não ocorrendo eficácia para a hidrólise ácida. A hidrólise ácida com o material sem pré-tratamento provocou a sacarificação da celulose, no entanto, os valores obtidos de glicose são menores do que os obtidos na hidrólise enzimática que foi de $39000 \pm 2700 \text{ mg.L}^{-1}$. O licor hidrolisado enzimaticamente foi usado para a produção de etanol por meio de fermentação submersa, utilizando *S. cerevisiae* (Y904), desta forma, obteve-se uma produção de etanol de $19,4 \text{ g.L}^{-1}$ em 7,3 h de fermentação. O monitoramento da cinética fermentativa em reator de batelada permitiu a avaliação do consumo de glicose, produção de etanol e massa microbiana. Em nível laboratorial a taxa específica máxima de crescimento foi de $0,3 \text{ h}^{-1}$, 96% de rendimento e produtividade de $2,7 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Palavras-chave: hidrólise, *Agave sisalana*, bioetanol.

ABSTRACT

The Brazilian energy matrix is one of the cleanest in the world and currently more than 45% of all energy consumed in the country comes from renewable sources. The alcohol is a fuel already has its place assured in the Brazilian energy matrix, therefore the second-generation ethanol can become a source of energy for Brazil and the world. A promising plant to produce bioethanol is the sisal because it has 90% of fermentable sugars and 10% more cellulose than sugar cane, in addition to Brazil is the world's largest sisal producer. The objective was to characterize the sisal fiber, as the concentration of sugars by HPLC and the physicochemical composition chemical and thermal by means of conventional methods and techniques XRD, TG, DSC and MEV; determine the best conditions for the pre-treatment followed by acid perform basic and acidic and enzymatic hydrolysis. In addition to ferment the hydrolyzate liquor higher concentration of glucose. To evaluate the pre-treating and the acid hydrolysis it was used two grain sizes 0.21 and 0.49 mm fiber and found the effects of temperature and the concentration of acid in the production of xylose and glucose using as a tool factorial design. To assess the enzymatic hydrolysis was verified by applying a factorial design, the load effect enzyme and the dry weight ratio of sisal fiber and enzyme extract. The were used commercial enzymes of Celluclast 1.5L and Novozyme beta-glucosidase proenzyme. The pretreatment followed basic acid proved to be very effective in concentrating cellulose, by removing the hemicellulose and lignin, resulting in an increase in cellulose from 54 to 83%. Revealed a crystallinity of sisal fiber, proven by X-ray diffraction, has changed the morphology of the fiber, verified by microscopy Scanning Electron, and by Thermogravimetry and Scanning Calorimetry Differential proved the degradation of hemicellulose and lignin. With the material pre-treated the enzymatic hydrolysis process was more efficient in saccharification, not occurring efficiency for acid hydrolysis. Acid hydrolysis of the material without pre-treatment caused saccharification of cellulose however the values obtained glucose are smaller than those obtained in the enzymatic hydrolysis was $39000 \pm 2700 \text{ mg l}^{-1}$. The enzymatically hydrolysed liquor was used to produce ethanol by through submerged fermentation using *S. cerevisiae* (Y904), this way was obtained an ethanol yield of 19.4 gL^{-1} in 7.3h of fermentation. The monitoring fermentation kinetics in batch reactor allowed assessment of glucose uptake, ethanol and microbial mass. In laboratory level the maximum specific rate growth was 0.3 h^{-1} , 96% yield and productivity $2.7 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Keyword: hydrolysis, *Agave sisalana*, bioethanol.

LISTA DE FIGURA

Figura 1	Plantação de sisal.....	15
Figura 2	Representação do complexo lignocelulósico antes e depois de um pré-tratamento.....	18
Figura 3	Desfibrador de agave.....	31
Figura 4	Moinho de facas.....	32
Figura 5	Reator pressurizado (a) Shaker (b) CLAE (c).....	34
Figura 6	Fluxograma para obtenção de etanol de segunda geração	43
Figura 7	Composição da fibra do sisal: (a) in natura e (b) pré-tratado.....	47
Figura 8	Distribuição granulométrica de menor partícula (a) e de maior partícula (b)	47
Figura 9	Difratogramas (a) fibra in natura (b) *fibra pré-tratada	48
Figura 10	Micrografias da fibra de sisal in natura (a)100x, (b) 500x, (c)1000x, (d)3000x.....	49
Figura 11	Micrografias da fibra do sisal pré-tratada (e) 50x, (f) 100x, (g) 500x, (h) 3000x.....	50
Figura 12	Curvas TG/DTG do sisal in natura.....	52
Figura 13	Curva DSC fibra de sisal in natura.....	53
Figura 14	Curvas TG/DTG da fibra de sisal pré-tratada.....	54
Figura 15	Curva DSC da fibra de sisal pré-tratada.....	55
Figura 16	Acompanhamento cinético para o tempo dos pré-tratamentos.....	56
Figura 17	Aumento cinético para o tempo de hidrólise.....	56
Figura 18	Diagrama de Pareto para pré-hidrólise ácida com maior granulometria (0,49mm)	58
Figura 19	Superfície de resposta para pré-hidrólise ácida com maior granulometria.....	60
Figura 20	Diagrama de Pareto do pré-tratamento ácido na menor granulometria	

	(0,21mm)	59
Figura 21	Diagrama de Pareto da hidrólise ácida com maior granulometria (0,49 mm)	63
Figura 22	Superfície de resposta para hidrólise ácida com maior granulometria (0,49 mm)	64
Figura 23	Diagrama de Pareto da hidrólise ácida com menor granulometria (0,21mm)	65
Figura 24	Diagrama de Pareto para hidrólise ácida com pré-tratamento ácido seguido de básico variável glicose.....	67
Figura 25	Perfil cinético da hidrólise enzimática: Carga = 10 FPU/g , Razão = 2% ■ Carga = 25 FPU/g, Razão = 2% ▲ Carga =10 FPU/g , Razão = 4% ✕ Carga 25 FPU/g , Razão = 4%.....	68
Figura 26	Diagrama de Pareto para a hidrólise enzimática em 36hs.....	70
Figura 27	Superfície de resposta para produção de glicose por hidrólise enzimática no tempo de 36 h.....	72
Figura 28	Perfil cinético da produção de etanol e consumo de glicose e comportamento microbiano em função do tempo para fermentação do licor hidrolisado enzimaticamente	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química de biomassa lignocelulósica com potencial para produção de etanol de segunda geração.....	17
Tabela 2	Métodos de pré-tratamento mais utilizados.....	22
Tabela 3	Comparação da hidrólise ácida e enzimática.....	26
Tabela 4	Rendimento das tecnologias de hidrólise da celulose.....	26
Tabela 5	Níveis reais e codificados das variáveis de entrada do planejamento.....	35
Tabela 6	Matriz do planejamento experimental das variáveis de entrada no planejamento da pré-tratamento ácido.....	35
Tabela 7	Níveis reais e codificados das variáveis de entrada no Planejamento Experimental da hidrólise ácida.....	36
Tabela 8	Matriz do planejamento experimental 2^2 e variáveis de entrada no planejamento da hidrólise.....	37
Tabela 9	Dados da hidrólise enzimática.....	38
Tabela 10	Níveis codificados e reais das variáveis independentes para o planejamento.....	39
Tabela 11	Matriz de planejamento fatorial 2^2	39
Tabela 12	Composição química da fibra in natura e pré-tratada.....	45
Tabela 13	Cristalinidade da fibra do sisal in natura e pré-tratada.....	49
Tabela 14	Dados obtidos nas curvas TG/DTG da fibra de sisal in natura	52
Tabela 15	Dados obtidos nas curvas DSC da fibra de sisal in natura	53
Tabela 16	Dados obtidos nas curvas TG/DTG da fibra de sisal pré-tratada	54
Tabela 17	Dados obtidos nas curvas DSC da fibra de sisal pré-tratada	55
Tabela 18	Matriz de planeja pré-hidrólise ácida fibra in natura maior granulometria (0,49mm).....	57
Tabela 19	Análise de variância (ANOVA) para pré-hidrólise ácida com maior granulometria.....	58
Tabela 20	Matriz de planejamento do pré-tratamento ácido da fibra in natura menor granulometria (0,21mm).....	60

Tabela 21	Matriz de planejamento para hidrólise ácida com maior granulometria (0,49 mm).....	62
Tabela 22	Análise de variância (ANOVA) para o licor hidrolisado com maior granulometria.....	63
Tabela 23	Matriz de planejamento para a hidrólise ácida com menor granulometria (0,21 mm).....	64
Tabela 24	Matriz de planejamento para a hidrólise ácida da fibra pré-tratada com ácido seguida de básico.....	66
Tabela 25	Concentração teórica de glicose para cada condição trabalhada.....	68
Tabela 26	Quantificação da glicose (mg.L^{-1}) da cinética da hidrolise enzimática.....	69
Tabela 27	Matriz de planejamento da hidrólise enzimática na melhor condição.....	70
Tabela 28	Análise de variância (ANOVA) para o licor hidrolisado com 36 horas.....	71
Tabela 29	Resultados obtidos para os parâmetros fermentativos referentes aos ensaios de fermentação conduzidos com o licor hidrolisado enzimaticamente.....	75

SUMÁRIO

CAPÍTULO - I	6
1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Justificativa	8
1.2. Objetivos	9
1.2.1. Objetivo geral	9
1.2.2. Objetivos específicos	9
CAPITULO – II	10
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1. Evolução do biocombustível no Brasil	12
2.2. Biomassa	13
2.2.1. Sisal (<i>Agave sisalana</i>)	14
2.3. Fibras lignocelulósicas	16
2.3.1. Celulose	18
2.3.2. Hemicelulose	19
2.3.3. Lignina	20
2.4. Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos	21
2.5. Inibidores	23
2.6. Hidrólise ácida	24
2.7. Hidrólise enzimática	25
2.8. Processo de fermentação	27
2.8.1. Fermentação e hidrólise separada (FHS)	28
2.8.2. Fermentação e sacarificação simultânea (FSS)	29
CAPITULO – III	30
3. METODOLOGIA	31
3.1. Matéria-prima	31
3.2. Pré-tratamento físico	31
3.2.1. Granulometria	32
3.3. Caracterização físico-química	32
3.4. Caracterização microestrutural e térmica	32

3.4.1. Difração de Raio X (DRX).....	32
3.4.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	33
3.4.3. Estudo térmico.....	33
3.5. Processos de hidrólise ácida e enzimática da fibra do sisal.....	33
3.5.1. Determinação do tempo dos tratamentos ácidos para fibra do sisal.....	34
3.5.2. Pré-tratamento ácido.....	35
3.5.3. Pré-tratamento alcalino.....	35
3.5.4. Hidrólise ácida.....	36
3.5.5. Hidrólise enzimática.....	37
3.5.5.1. Determinação da atividade enzimática.....	37
3.5.5.2. Preparação do extrato enzimático.....	37
3.5.5.3. Procedimento de hidrólise enzimática.....	37
3.6. Fermentação.....	39
3.6.1. Determinação de células por densidade ótica.....	40
3.6.2. Determinação dos parâmetros fermentativos.....	40
3.6.2.1. Fator de conversão de glicose em etanol.....	40
3.6.2.2. Produtividade volumétrica em etanol (QP).....	40
3.6.2.3. Eficiência de conversão η (%).....	40
3.6.2.4. Porcentagem de consumo de glicose (Y%).....	41
3.6.2.5. Cálculo da velocidade específica máxima de crescimento (μ_x).....	41
CAPITULO - IV.....	43
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1. Caracterização do material lignocelulósico.....	44
4.2. Granulometria.....	46
4.3. Determinação da cristalinidade da fibra do sisal por difração de raio X.....	47
4.4. Análise morfológica da fibra do sisal por microscopia eletrônica de varredura.....	48
4.5. Caracterização térmica.....	50
4.6. Determinação dos tratamentos ácidos para fibra do sisal.....	55
4.7. Tratamento ácido.....	56
4.7.1. Pré-tratamento ácido para maior granulometria.....	56
4.7.2. Pré-tratamento ácido para menor granulometria.....	58

4.7.3. Tratamento ácido seguido de básico.....	60
4.8. Hidrólise ácida.....	61
4.8.1. Hidrólise ácida para maior e menor granulometria.....	61
4.8.2. Hidrólise ácida fibra pré-tratada ácida seguida de básico.....	65
4.9. Hidrólise enzimática.....	66
4.10. Fermentação.....	71
4.10.1. Avaliação da fermentabilidade do licor da hidrólise enzimática.....	71
4.10.2. Cinética de fermentação para a produção de etanol.....	73
4.10.2. Determinação dos parâmetros fermentativos.....	73
CAPITULO - V.....	76
5. CONCLUSÃO.....	77
CAPITULO - VI.....	78
REFERÊNCIAS.....	80

Capítulo I

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A matriz energética brasileira é uma das mais limpas do mundo e, atualmente, mais de 45 % de toda a energia consumida no país provém de fontes renováveis. Nos países desenvolvidos, esse percentual é de cerca 13 % (EPE, 2012).

Debates sobre a polêmica participação dos biocombustíveis no aumento do preço dos alimentos e sobre o protecionismo velado adotado pelos Estados Unidos e Europa para obstaculizar a produção de biocombustíveis acontecem porque, segundo os economistas, afetariam a economia global, ou os fundos de pensão ou a saúde financeira do Oriente Médio, dos EUA e de outras nações ricas em carbono que resistem a um acordo climático global. Mas, com tanto dinheiro e poder ligado ao petróleo, ao carvão e ao gás, congelar os estoques globais de combustíveis fósseis demanda pensar alto e possuir políticas duras, além de muita pressão pública.

As crises energéticas e o colapso ambiental resultante do efeito estufa são também problemas graves que exigem uma solução urgente. Nesse contexto, a utilização de energias limpas e renováveis, sobretudo nos países tropicais, surge como alternativa. Devido ao seu clima e à grande extensão territorial, o Brasil é um país que se apresenta com um significativo potencial energético, capaz de atender à necessidade mundial, além de possuir experiência quanto ao uso de energia limpa e renovável como o álcool produzido a partir da cana-de-açúcar (CORTEZ e LORA, 2008).

Por motivos econômicos geopolíticos e ambientais, as atenções do mundo se voltam para as fontes alternativas de energia, em especial, para o etanol. O estabelecimento de metas, extremamente ambiciosas para o aumento do consumo deste álcool, nos próximos anos, principalmente nos países desenvolvidos, requer um aumento substancial na produção de etanol e, nesse sentido, estimula a pesquisa e o desenvolvimento de novas matérias-primas para o álcool etílico, como a biomassa lignocelulósica, e a construção de biorrefinarias integradas, um conceito análogo das refinarias de petróleo (ALAIN, 2010).

O álcool é um combustível que já tem o seu lugar assegurado na matriz energética brasileira, isto porque, em resposta às crises do petróleo da década de 70, o governo brasileiro criou o PROÁLCOOL, programa lançado em 1975, que tinha o objetivo de garantir o suprimento de combustível para o país: substituir a gasolina por um combustível

renovável e encorajar o desenvolvimento tecnológico da indústria da cana-de-açúcar e do álcool (BRASIL, 2007).

Na atualidade, a busca por alternativas para a produção de etanol nos leva a novas fontes de biomassa, neste âmbito, vale lembrar que o Brasil é conhecido por seu grande potencial de produção de recursos renováveis tais como, resíduos agrícolas (como o bagaço de cana-de-açúcar, a palha de arroz, a palha de trigo, a casca de aveia e casca de frutas, entre outros), resíduos florestais (como aparas de madeira, pó e restos de serraria) e culturas como o salgueiro e capim-elefante (GALBE e ZACCHI, 2010).

Na produção do álcool utilizando como matéria-prima a biomassa lignocelulósica, proveniente de resíduos da agroindústria e culturas vegetais, são empregadas três etapas de processamentos que são: pré-tratamento para separar celulose e lignina; hidrólise ácida ou enzimática, para transformação de celulose em glicose e fermentação alcoólica por leveduras (ROSSEL, 2006).

Nesse contexto, o sisal surge como uma matéria-prima alternativa para produção de etanol de segunda geração, devido a sua disponibilidade, por não ser usado como fonte de alimento e possuir alta concentração de açúcares fermentescíveis.

1.1. JUSTIFICATIVA

A crescente demanda por energia nos faz buscar fontes renováveis de combustíveis para suprir as necessidades atuais e futuras. Hoje, com as novas tecnologias de produção de etanol de segunda geração, podemos utilizar resíduos vegetais na produção do bioetanol através da hidrólise ácida ou enzimática para transformação de biomassa em açúcares fermentescíveis.

A substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis tem sido estimulada pelo governo, não apenas em virtude da volatilidade e do aumento dos preços do petróleo, mas pela perspectiva de limitação das reservas e pela preservação do meio ambiente. Não parece haver dúvida sobre o esgotamento da oferta mundial de fontes fósseis, a incerteza é quando isso acontecerá (FUKUDA et al., 2009).

Diante disso, o etanol de segunda geração pode se tornar uma fonte de energia promissora para o Brasil e o mundo, também chamado etanol lignocelulósico, por ser obtido a partir da celulose, hemicelulose e lignina, componentes da biomassa e principais

constituintes dos resíduos vegetais que não servem à alimentação humana e são pobres para ração animal.

Uma planta promissora na produção de bioetanol é o sisal, essa planta possui 90% de açúcares fermentáveis e 10% a mais de celulose se comparada com a cana-de-açúcar em forma in natura (FAPESP, 2009).

A Paraíba foi o maior produtor de Sisal (*Agave sisalana*) do mundo, sendo hoje a Bahia. A adoção de novas tecnologias na produção do etanol poderá revitalizar a cultura do sisal no estado da Paraíba. (SOUSA, 1987).

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de utilização da fibra do sisal (*Agave sisalana*) através das hidrólises ácida e enzimática na produção de licores para fermentação alcoólica e obtenção do bioetanol.

1.2.2. Objetivos específicos

- Realizar a caracterização físico-química da fibra do sisal por meio de análises de umidade, cinzas, extrativos, celulose, hemicelulose e lignina;
- Caracterizar estruturalmente e morfológicamente a fibra do sisal por DRX e MEV;
- Avaliar o comportamento térmico da fibra do sisal pelo uso de técnicas de Termogravimetria e Calorimetria Exploratória Diferencial através de TG/DTG e DSC;
- Utilizar como ferramenta o planejamento experimental para determinar as condições ótimas do pré-tratamento ácido e da hidrólise ácida e enzimática;
- Determinar as concentrações de açúcares, furfural, hidroximetilfurfural (HMF), ácido acético e álcool, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE;

- Fermentar o licor hidrolisado do processo que fornecer maior concentração de glicose;
- Determinar os parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica (fator de conversão de glicose em etanol, produtividade volumétrica em etanol, eficiência de conversão, porcentagem de consumo de glicose, velocidade específica máxima de crescimento celular).

Capítulo II

Fundamentação Teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo, serão apresentados estudos realizados sobre a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, desde os primeiros processos até a produção de etanol de segunda geração.

2.1. A evolução dos biocombustíveis no Brasil

Com as previsões de escassez das reservas petrolíferas mundiais e com a preocupação com o meio ambiente, a necessidade de encontrar um substituto para os combustíveis de origem fóssil torna-se iminente, desta forma, as fontes renováveis de biomassa se apresentam como melhores alternativas para um futuro sustentável da humanidade (PAIXÃO, 2009).

No Brasil, os primeiros passos rumo à obtenção de biocombustíveis foram dados com o etanol de cana no ano de 1920 (PAIXÃO, 2009). O fortalecimento da produção veio com o lançamento do Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL) na década de 1970. Até o ano de 1977, que corresponde à primeira fase do PROÁLCOOL, a ênfase do programa foi a produção de álcool anidro, com um percentual de 99,33% de etanol, para ser misturado à gasolina. A crise do petróleo de 1979 mudou o foco para a produção do álcool hidratado para ser utilizado diretamente como combustível, fato que ocorreu já na segunda fase do programa (IDEA, 2007).

Na década de 1970, foram convertidos os primeiros motores de veículos que funcionavam apenas com álcool e, cinco anos depois, 17% da frota nacional já era constituída desses carros. Um protocolo assinado entre o Governo Federal e fabricantes de automóveis deu um novo incentivo ao programa e, em decorrência disso, destilarias foram montadas com o fim exclusivo de produzir álcool diretamente da cana-de-açúcar (BIODIESELBR, 2013).

Em 2003, um fato marcou o surgimento de um novo impulso para o setor sucroalcooleiro. O ano marcou a primeira fase da consolidação de um grande salto tecnológico: o advento dos veículos bicombustível, também conhecidos como *flex-fuel*, os quais podiam usar álcool ou gasolina, sem a necessidade de nenhuma adaptação ou ajuste, o que deu um novo impulso à produção nacional de etanol (MACEDO e NOGUEIRA, 2010).

Atualmente no Brasil existem aproximadamente 418 usinas de processamento de cana-de-açúcar, sendo 155 produtoras de álcool, 15 produtoras de açúcar e 248 produtores de álcool e açúcar (BRASIL, 2011). O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, com uma produção anual de 22,2 milhões de m³ (BRASIL, 2010), cerca de 38% da produção mundial. Na safra de 2009/2010, foram processadas 489 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, o que representa 14 % da matriz energética do país (BRASIL, 2010).

Uma das vantagens que confere competitividade ao etanol em nível mundial são os custos de produção. No Brasil, os custos estariam entre 30 a 50%, inferior ao custo do etanol norte-americano produzido a partir do milho e 75% do custo do etanol europeu a partir da beterraba (BASTOS, 2009).

Do ponto de vista da oferta, as tecnologias de primeira geração deverão garantir um crescimento relativamente constante no mercado do etanol até 2018 (KOHLHEPP, 2010). Assim, os produtores mundiais precisarão de tecnologias da geração seguinte. Caso contrário, teremos o limite da oferta em relação à competição entre o uso da terra para a geração de energia e a produção de alimentos.

O etanol de segunda geração, produzido a partir da celulose, presente nos resíduos da cana-de-açúcar e em outras matérias-primas vegetais (fibra de sisal, bagaço de milho), é uma alternativa fundamental aos países capazes de produzir o combustível renovável e que desejam fazê-lo sem prejudicar a produção de alimentos.

Segundo Rodrigues, (2011) uma das poucas fontes que tem potencial para atender a estes desafios de sustentabilidade é a biomassa que aparenta ser a única matéria-prima viável frente aos recursos existentes para a produção de combustíveis de transportes e de produtos químicos, já que é o único material rico em carbono disponível no planeta, além dos fósseis.

2.2. Biomassa

Biomassa é toda matéria orgânica de origem animal ou vegetal, que pode ser utilizada na produção de calor, seja para uso térmico industrial, seja para geração de eletricidade e/ou que pode ser transformada em outras formas de energias sólidas (carvão vegetal), líquidas (etanol, biodiesel) e gasosas (biogás) (BRASIL, 2012).

Entre as fontes para produção de energias renováveis, a biomassa apresenta um grande potencial de crescimento nos próximos anos, de acordo com os estudos de planejamento do Ministério de Minas e Energia (MME). Ela é considerada uma alternativa viável para a diversificação da matriz energética dos países, em substituição aos combustíveis, como petróleo e carvão (BRASIL, 2012).

O etanol de segunda geração pode ser obtido a partir da tecnologia lignocelulósica, que utiliza o bagaço, palha da cana-de-açúcar, sabugo de milho, fibra de sisal, com vantagens ambientais e econômicas. Calcula-se que esses compostos orgânicos, hoje praticamente sem valor comercial, correspondam a cerca de 50 % da biomassa terrestre. A produção de etanol da lignocelulose extraída desses materiais é feita com tecnologias ainda em fase de aperfeiçoamento. Nesse processo, a fabricação de etanol se dá a partir de resíduos vegetais e é dividido em cinco etapas: pré-tratamento do material lignocelulósico, deslignificação, hidrólise ácida ou enzimática, fermentação e destilação (BIODIESELBR, 2013).

Conhecer a biomassa a ser utilizada em um processo, além de fornecer informações para que seja estabelecido um conceito de qualidade, é importante para se detectar variabilidade em determinado tipo de matéria-prima, para possibilitar a otimização do processo e para calcular os custos de produção.

2.2.1. Sisal (*Agave sisalana*)

O sisal (*Agave sisalana*) é originário de Yucatan (México) e seu nome popular provém de uma erva nativa denominada zizal-xiu (MEDINA, 1959). Em relação à denominação botânica, o sisal pertence à classe Monocotiledônea, série Liliflorea, família Agavaceae, subfamília Agavoidea, gênero *Agave*, espécie *Agave sisalana*. A designação *Agave* provém do grego *agavos* que significa admirável, magnífico; e *sisalana* significa rigidez (PAIVA, 2002).

O cultivo da planta é feito de maneira muito simples na região Nordeste do Brasil, já que é uma cultura pouco exigente. Os tratamentos culturais são resumidos à capina e à erradicação dos brotos, também chamado de “filhotes”. O corte é feito manualmente com foice ou faca, bem rente ao tronco, com o cuidado de se deixar pelo menos dez folhas na planta (SILVA, 1994). As folhas do sisal produzem uma fibra altamente resistente e que é utilizada para produzir artesanatos, vassouras, sacos, bolsas, chapéus, barbantes, cordas,

capachos e tapetes, bem como na fabricação de celulose para a produção de papel Kraft de alta resistência (PROSSIGA, 2004; CAMPBELL, 2004).

O sisal (Figura 1) aparece como uma matéria-prima ideal para a produção de etanol pelo seu custo relativamente baixo de biomassa, sua alta disponibilidade no Brasil, e por não ser usado como fonte de alimento e, ao mesmo tempo, apresentar alto teor de celulose, cerca de 10% a mais do que o bagaço de cana. Considerando também a hemicelulose, a fibra de sisal tem cerca de 90% de material gerador de açúcares fermentáveis, que formam etanol a partir do processo de fermentação. Esses açúcares são gerados a partir da hidrólise, que, de forma simplificada, pode ser considerada como uma reação em que são rompidas as ligações que unem muitas unidades de glicose na celulose e também unidades de outros açúcares na hemicelulose (FAPESP, 2009).

Figura 1 - Plantação de sisal



Fonte: De Paula et al., (2008).

A caracterização da matéria-prima permite adotar critérios de qualidade em relação às características de uma determinada biomassa, para obtenção de biocombustíveis.

A umidade pode variar de acordo com o material utilizado, Oliveira et al., (2011) trabalhando com bagaço do sorgo sacarino para a obtenção de etanol, encontrou um percentual de umidade de 7,7%, assemelhando-se com o citado por Neumann et al., (2004) que encontrou valores que variam de 7,4 a 8,8% de umidade, porém, em outros materiais, esse valor pode chegar a 11,30% como no caso da palma forrageira (OLIVEIRA et al.,

2011). Da mesma forma, a cinza, que é composta por material mineral também pode variar de material para material. Canilha, (2010) trabalhando com palha de arroz para produção de biocombustíveis relata valores de cinzas de 2,4% sendo o menor valor e tendo como maior valor a palha de trigo com 9,9%, devemos levar em conta que o material mineral presente nas plantas pode modificar de acordo com o solo, variedade e clima.

Em relação aos extrativos em solventes orgânicos, Leão et al., (2013) trabalhando para obtenção de bioetanol encontraram na fibra e no bagaço de sisal 5,8 e 8,5%, respectivamente. De Paula et al., (2008) trabalhando com polpa de sisal encontrou valores semelhantes, porém, Bragatto et al., (2010) trabalhando com clones de eucalipto encontraram valores que variaram de 15,09% a 21,93%, mostrando, dessa forma, as variações que podem ocorrer entre materiais lignocelulósicos.

2.3. Fibras lignocelulósicas

A lignocelulose é um complexo rígido composto de diferentes moléculas, que constitui quase a totalidade da parcela estrutural das plantas, ou seja, a maior porcentagem da biomassa dos vegetais. É um substrato de custo baixo que é considerado resíduo final industrial e agrícola, e as composições desses materiais variam e são constituídas principalmente por celulose (35-50%) seguida pela hemicelulose (20-30%) e lignina (10-25%) e podem ser transformadas em energia e produtos químicos (KUMAR et al., 2009).

A proporção de cada componente depende da fonte a partir da qual o material foi extraído (Tabela 1), além de poder sofrer influências de condições climáticas, tipo de solo, dentre outros fatores. Pequenas proporções de proteínas, lipídeos (gorduras, ceras e óleos) e cinzas normalmente também estão presentes (HIMMEL et al., 2007).

Tabela 1 - Composição química de biomassa lignocelulósica com potencial para produção de etanol de segunda geração

Biomassa Lignocelulósica	% Celulose	% hemicelulose	% Lignina
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73.1	14.2	11
Palha de arroz	43.3	26.4	16.3
Fragem de milho	38-40	28	7-21
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19

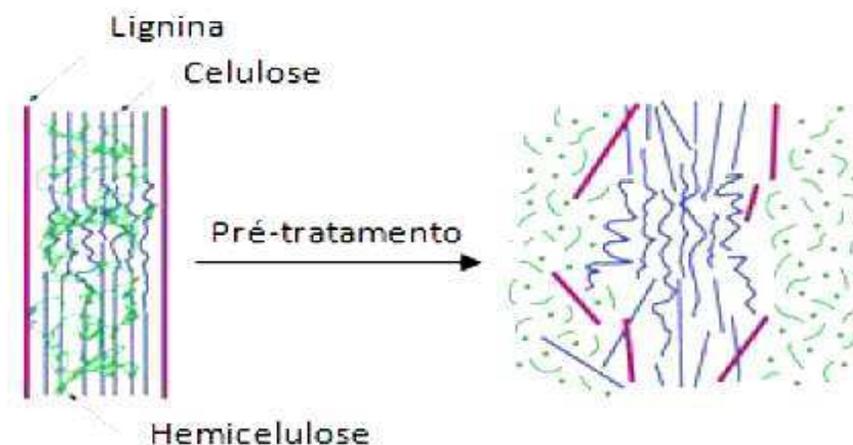
Fonte: Gomez et al., (2010).

Além das pontes cristalinas serem extremamente agregadas, a lignina e a hemicelulose, parcelas mais externas, conferem proteção à estrutura cristalina da celulose. Isto dificulta a ação de enzimas que consigam degradar esses polímeros, pois fica bloqueado o contato ótimo entre o sítio de ligação e a parcela catalisadora. A hemicelulose, por englobar moléculas pequenas, se comparada à celulose, e por compor a parte mais externa da parcela estrutural, é mais facilmente degradável e já se tem descritas enzimas capazes de clivar cada composto separadamente. Para a sacarificação ótima, a celulose deve ficar o mais exposta possível, o que torna imprescindível a degradação da hemicelulose em pelo menos 50% (MOSIER et al., 2009).

Geralmente é necessária a ruptura do complexo lignina-celulose-hemicelulose ou a remoção de cada fração por técnicas de pré-tratamento (Figura 2) e deslignificação para que

possam ser utilizadas como substratos em processos microbianos para a obtenção de produtos de valor agregado (ROCHA e SILVA, 2006).

Figura 2 - Representação do complexo lignocelulósico antes e depois de um pré-tratamento



Fonte: Balat (2010).

2.3.1. Celulose

A celulose ($C_6H_{10}O_5$), principal componente da parede celular da fibra vegetal, é um polímero de cadeia longa composto de um só monômero (glicose) e, por isso, classificado como homopolissacarídeo. É a matéria orgânica mais abundante sobre a Terra, consistindo aproximadamente em 50% de toda a biomassa e uma produção anual de cerca de 100 bilhões de toneladas (YANG et al., 2010).

O comprimento das cadeias de celulose pode variar de 1.000 a 15.000 unidades de glicose, dependendo da origem e do possível grau de degradação durante o processo de isolamento (FENGEL e WEGENER, 2009). Seu tamanho é normalmente expresso em termos do grau de polimerização, ou seja, o número de unidades de glicose anidra presente em cada fibra. No entanto, a análise estrutural da cadeia polimérica informa que sua unidade de repetição é a celobiose (RAMOS, 2003). Isto se deve às ligações do tipo β , pelas quais os monômeros de glicose são unidos, fazendo com que moléculas adjacentes encontrem-se arranjadas com uma rotação de 180° entre si (STRYER, 2006).

2.3.2. Hemicelulose

Outro componente essencial na parede celular das plantas são as hemiceluloses. Estas macromoléculas estão intimamente ligadas à celulose, definindo propriedades à parede celular e desempenhando funções de regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas (FENGEL e WEGENER, 2009; LIMA e RODRIGUES, 2007). As hemiceluloses são polissacarídeos formados por diferentes unidades de açúcares pertencentes aos grupos das pentoses, hexoses, ácidos hexourônicos e desoxiexoses.

Estes polissacarídeos consistem, principalmente, de cadeias poliméricas ramificadas com grau de polimerização de 100 a 200 unidades de açúcares, entre os quais incluem como principais componentes: glicose, galactose, manose, xilose, arabinose e ácido glucurônico que podem ser lineares ou ramificados, além de serem amorfos e possuírem massa molar relativamente baixa (LIMA e RODRIGUES, 2007). As hemiceluloses encontram-se intercaladas às microfibrilas de celulose, promovendo a elasticidade e impedindo que elas se toquem (RAMOS, 2003). Estas macromoléculas são solúveis em água e facilmente solubilizados em solução alcalinas. Diferentemente da celulose, as hemiceluloses são constituídas por vários tipos de unidades de açúcares. Estas macromoléculas são ramificadas e apresentam cadeias curtas, além de serem solúveis em álcalis fortes e são fundamentalmente amorfas, sendo mais suscetíveis a pré-tratamentos químicos (SUKUMARAN et al., 2009).

A hemicelulose é o segundo mais abundante polissacarídeo no planeta, sendo um dos principais constituintes estruturais da parede celular dos vegetais, tendo função conectora entre as fibrilas de celulose e a lignina, além de conferir maior rigidez à rede estrutural da mesma (FERREIRA e SILVA, 2009; GÍRIO et al., 2010; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). Representa de 20 a 35% da composição química dos vegetais, cerca de 24% do bagaço de cana-de-açúcar (RODRIGUES et al., 2011). Freitas, (2011) trabalhando com sabugo de milho encontrou um percentual de 28,1 % de hemicelulose, Mariano Neto, (2013) estudando a palma forrageira para produção de etanol encontrou 10,81%, Umikalsen et al., (2007) encontraram valores superiores para a palma entre 14 e 16%, Rossel, (2006) trabalhando com bagaço de cana-de-açúcar obteve 25,2% de hemicelulose, Gomes, (2010) trabalhando com algodão encontrou o menor percentual de

hemicelulose que foi de 2%. Desta forma, observa-se que o percentual desse polissacarídeo pode ter variações de acordo com o tipo de material.

2.3.3. Lignina

A macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos depois da celulose é a lignina, e representa de 20 a 30% (Tabela 1) da massa total do material lignocelulósico. A lignina age como agente de enrijecimento, como material adesivo e como barreira contra degradação enzimática e ou microbiana da parede celular, fornecendo um suporte estrutural à parede secundária das plantas (FENGEL e WEGENER, 2009).

A lignina é um polímero que possui uma estrutura polifenólica complexa, uma substância que vai sendo incorporada durante o crescimento do vegetal, sendo composta basicamente de unidades de fenilpropano.

Pode ser definida como um material polifenólico amorfo com estrutura tridimensional baseada em três precursores monoméricos: os alcoóis p-cumarílico, coniferílico e sinapílico que geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas, respectivamente (DENCE e LIN, 1992).

A lignina, além de ser um dos inibidores do processo de sacarificação da celulose e hemicelulose e da fermentação de açúcares para produção de etanol, pode afetar o processo de sacarificação da biomassa em açúcares fermentáveis, podendo adsorver irreversivelmente as enzimas hidrolíticas e/ou ácidos, bloqueando sua ação na celulose (PALONEN et al., 2004) e, por ser hidrofóbica, pode também prevenir que a fibra celulósica se intumescça, o que diminui a área de superfície acessível às enzimas e aos solventes que realizam a hidrólise da celulose (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000).

Philippini, (2012) trabalhando com variedades de bagaço de cana-de-açúcar in natura, para a produção de etanol lignocelulósico, encontrou valores que variaram de 23,9 a 37,28%, contudo, Megiatto (2007) encontrou na fibra do Sisal 13,5%, valor bem próximo ao encontrado por Leão et al., (2013) com o mesmo material e nas mesmas condições, Santos (2012) obteve na palha da cana-de-açúcar de 22 a 25% de lignina.

Assim, verifica-se que as quantidades de lignina nas fibras são abundantes, fazendo-se necessária a remoção do máximo desse material para ter um processo de hidrólise mais eficiente, essa remoção é realizada através dos pré-tratamentos.

2.4. Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos

O processo mais desafiador na produção de combustível de segunda geração é o pré-tratamento da biomassa. Os métodos de pré-tratamento se referem à solubilização e a separação de um ou mais componentes dessa biomassa. Devido à natureza cristalina da celulose, a barreira física formada por ligninas ao redor das fibras celulósicas e a presença de complexas interações entre hemicelulose e celulose nas paredes celulares dos vegetais e entre estes polissacarídeos e ligninas representam uma etapa imprescindível na rota de produção, pois objetiva separar a matriz de lignina, reduzir a cristalinidade da celulose, aumentar a fração amorfa da mesma e solubilizar a hemicelulose, separando o hidrolisado da celulose para que o mesmo fique mais acessível às hidrólises biológicas e químicas (SARKAR et al., 2012).

Para ser considerada eficaz, esta etapa deve diminuir o grau de polimerização das moléculas de celulose, de forma que se tornem acessíveis ao processo de hidrólise, evitar formação de subprodutos inibidores dos processos de hidrólise e fermentação e, principalmente, ser economicamente viável. Segundo Zhang et al.,(2004) a remoção da lignina e a solubilização da hemicelulose é uma das mais urgentes prioridades para que a rota de processamento de etanol de segunda geração produza um combustível competitivo. Existem diversos métodos de pré-tratamento (Tabela 2), que podem ser físicos, químicos ou físico-químicos (BARRETO, 2009).

Tabela 2 - Métodos de pré-tratamento mais utilizados

Processos	Descrição
Físico	
Explosão a vapor	A biomassa triturada é tratada com vapor (saturado, 160 a 260 ° C) seguida de uma rápida descompressão.
Termohidrólise	Utiliza água quente e alta pressão (pressões acima do ponto de saturação) para hidrolisar a hemicelulose.
Químicos	
Hidrólise ácida	Por meio do uso de ácidos sulfúrico, clorídrico ou nítrico, concentrados ou diluídos.
Hidrólise alcalina	Pelo uso de bases como hidróxido de sódio ou cálcio.
Organosolve	Uma mistura de um solvente orgânico (metanol, etanol, acetona) com um catalisador ácido (H ₂ SO ₄ , HCl) é usada para quebrar as ligações internas da lignina e da hemicelulose.
Biológicos	Utilização de fungos para solubilizar a lignina. Geralmente é utilizada em combinação com outros processos
Combinados	
Explosão a vapor catalisada	Adição de H ₂ SO ₄ ou CO ₂ combinada com explosão de vapor pode aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, diminuir a produção de compostos inibidores e promover uma remoção mais completa da hemicelulose.
Afex (ammonia fibre explosion) Explosão de CO ₂	Explosão à amônia líquida a alta temperatura e pressão por um período de tempo, seguida de uma rápida descompressão Similar à explosão de vapor.

Fonte: Rabelo (2007).

O processo mais desafiador na produção de combustível de segunda geração é o pré-tratamento da biomassa. Esse método se refere à solubilização e à separação de um ou mais componentes dessa biomassa, para que o mesmo fique mais acessível às hidrólises biológicas e químicas (SARKAR et al., 2012).

No pré-tratamento ácido, a cadeia de hemicelulose é hidrolisada, enquanto no alcalino, a lignina é solubilizada (HAHN-HÄGERDAL et al., 2010).

Rodrigues, (2011) estudando o pré-tratamento com ácido sulfúrico (H_2SO_4) diluído a uma concentração de 1,5% por 90 min, para dois materiais distintos: bagaço de cana e uma forrageira (*Brachiaria brizantha* cv.) removeu 82 e 73% de hemicelulose, respectivamente, dessas biomassas.

Os tratamentos alcalinos utilizam valores baixos de pressão e temperatura se comparado com outras tecnologias de pré-tratamentos. Pode também ser processado em condições ambientes, porém, exigindo um período muito grande (horas ou dias, ao invés de minutos ou segundos). A aplicação de soluções alcalinas remove grande parte da lignina por meio do rompimento das ligações estruturais, melhorando a reatividade dos polissacarídeos remanescentes (MOSIER et al., 2009).

Nascimento, (2011) trabalhando com bagaço de cana-de-açúcar com NaOH a 7% por 30 min a 120 °C, obteve a deslignificação do material em 95% da biomassa.

Silverstein et al., (2009) investigaram o pré-tratamento químico de caule de algodão e reportaram que o pré-tratamento com NaOH resultou no mais alto nível de deslignificação 65,6% com 2% de NaOH, 90 min a 121 °C.

Mendes et al., (2012) trabalhando com a forrageira *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e um pré-tratamento ácido seguido de básico, obteve os melhores resultados usando uma concentração de 1,5% (v/v) de H_2SO_4 e a 4% NaOH, por 90 min, resultou um material com 92,36% de celulose.

Segundo Ogeda et al., (2010) dentre os pré-tratamentos citados, o menos vantajoso, mesmo que muito utilizado, é o com ácido concentrado, pois são necessários equipamentos resistentes a condições extremas ocasionadas pelo baixo pH resultante deste tratamento, além de ocorrer a produção de subprodutos tóxicos e a inibição da ação enzimática e do crescimento celular, etapas posteriores essenciais para a obtenção do etanol com alto rendimento.

2.5. Inibidores

A consequência das altas temperaturas empregadas nos pré-tratamentos químicos é a degradação dos açúcares originados, provocando a formação de compostos que podem interferir, posteriormente, no processo de fermentação e hidrólise do material lignocelulósico. Martin et al., (2007) relataram a produção dos seguintes inibidores: ácido

acético (formado pela hidrólise do grupo acetil, presente na fração hemicelulósica), aldeídos, alcoóis aromáticos, bem como compostos fenólicos (formados principalmente pela degradação parcial da lignina) e furaldeídos, como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural (HMF) (formados pela degradação de pentoses e hexoses), que, por sua vez, podem dar origem a outros produtos, como os ácidos fórmico e levulínico, respectivamente (JARDINI et al., 2009).

Segundo Palmqvist e Hahn-Hängerdal, (2000) concentrações inferiores a 1; 1,5 e 3 g.L⁻¹ de furfural, HMF e ácido acético, respectivamente, não atuam como inibidores no processo de fermentação.

Desta forma, Baudel et al., (2006) enfatizam que o pré-tratamento deve ser eficiente em termos de rendimento e funcionalidade, com redução de insumos químicos e de energia, visando uma menor geração desses compostos inibitórios.

2.6. Hidrólise ácida

A hidrólise ácida pode ser dividida em duas categorias: realizada com soluções concentradas ácidas ou soluções diluídas. O processo envolvendo soluções diluídas é o mais antigo utilizado, e envolve a utilização da biomassa celulósica suspensa na solução ácida (0,1 - 5% v/v), normalmente, sobre pressão altas temperaturas (de 180 a 215 °C) (GRAF e KOEHLER, 2000). Neste método, existem algumas vantagens com a menor quantidade de ácido (custo), o menor tempo de reação devido a temperaturas altas (reações mais rápidas) e a menor interferência na fermentação dos açúcares por microrganismos, devido ao pH não ser tão baixo.

A hidrólise ácida, apesar de seu baixo custo, apresenta as desvantagens de corrosão e meio reacional agressivo, com formação de subprodutos (WYMAN, 2005). Se, por um lado, o uso de ácido diluído (como 1% ácido sulfúrico) é mais brando, sua reação requer temperatura muito mais alta (cerca de 220 °C) que provoca a degradação da glicose a subprodutos como hidroximetilfurfural (GRAF e KOEHLER, 2000). Por outro lado, o uso de ácidos concentrados (como por exemplo, 75% ácido sulfúrico) requer temperaturas mais moderadas para alcançar altas produtividades semelhantes as das enzimas celulasas. Porém, o meio reacional torna-se, neste último caso, altamente corrosivo.

As investigações de Lavarack et al., (2011) demonstraram que o ácido clorídrico é menos eficiente na degradação do bagaço para produção de açúcares quando comparado ao

ácido sulfúrico, e Villar (2010) relata que o ácido sulfúrico (H_2SO_4) é o catalisador mais eficiente na degradação da celulose presente no bagaço da cana-de-açúcar para a obtenção de açúcares para fermentação alcoólica. O rendimento total de vários açúcares obtidos chega a 63% do peso do material lignocelulósico usado na hidrólise com soluções ácidas diluídas. Por outro lado, o mesmo autor relata haver um aumento significativo no rendimento de açúcares do bagaço em concentrações de solução de H_2SO_4 maiores que 2%.

Fouad et al., (2009) conseguiram taxas de conversão de 97,5% da taxa máxima teórica de conversão com a utilização de H_2SO_4 diluído a 6% com tempo de reação de 120 minutos a 180 °C.

Leão et al., (2013) trabalhando com bagaço de sisal com H_2SO_4 , diluído a 5% na temperatura de 180 °C por 60 min, obteve valores próximos a 4000 mg.L⁻¹ de glicose.

2.7. Hidrólise enzimática

O uso de enzimas para a obtenção de açúcares de biomassa vem se tornando uma alternativa interessante para produção de etanol lignocelulósico. As evoluções na pesquisa e desenvolvimento desta área estão abrindo novas possibilidades para a produção de biocombustíveis que não afetam a produção alimentícia, mostrando efetivas reduções de custos e facilitando a inserção dessa tecnologia no ambiente produtivo atual.

A hidrólise enzimática do material celulósico é conduzida através de enzimas celulasas que são altamente específicas. Celulasas são usualmente uma mistura de diversas enzimas. Os três maiores grupos de celulasas que estão envolvidas no processo de hidrólise são: endoglucanases, exoglucanases e betaglucosidase (SUN e CHENG, 2005). As celulasas quebram a celulose em celbiose, que é subsequentemente clivada a glicose pela betaglucosidase (PALMQVIST e HAHN-HÅGERDAL, 2000). As endoglucanases agem de forma aleatória, clivando ligações beta, dentro da molécula da celulose; as celbiohidrolases (exoglucanases) removem as unidades de celbiose a partir das extremidades da cadeia da celulose e a β -glicosidase quebra celbiose em duas unidades de glicose (LIMA et al., 2005). Segundo Martin et al., (2006) a hidrólise é necessária para a conversão de polissacarídeos da lignocelulose a açúcares fermentescíveis.

Embora os processos de hidrólise ácida estejam mais desenvolvidos tecnologicamente, espera-se que os processos enzimáticos tenham seus custos bastante reduzidos com o avanço da tecnologia envolvida e venham a ser a melhor opção no futuro

(Tabelas 3-4), uma vez que a hidrólise enzimática é usualmente conduzida em condições suaves como pH e temperatura, além de não apresentar problemas de corrosão nos equipamentos (RABELO, 2007).

Tabela 3 - Comparação da hidrólise ácida e enzimática

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

Fonte: Krishna et al., (2009).

Tabela 4 - Rendimento das tecnologias de hidrólise da celulose

Tecnologia	Consumíveis	Temperatura	Tempo	Sacarificação
Ácido diluído	~1 % H ₂ SO ₄	180 °C	45 min	82%
Ácido concentrado	70 % H ₂ SO ₄	50 °C	60 min	88%
Enzimático	Celulase	50 °C	horas	95%

Fonte: Seabra (2008).

A hidrólise enzimática gera menor quantidade de resíduos e tem menor impacto ambiental, consumindo também uma menor quantidade de energia.

Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (OLSSON, 1996).

Santos e Gouveia, (2009) trabalhando com a produção de bioetanol, por meio da hidrólise enzimática a partir do bagaço de cana-de-açúcar, constataram que a presença de lignina na hidrólise do material não deslignificado foi um fator limitante ao acesso das enzimas e, conseqüentemente, a presença de compostos fenólicos provenientes da presença de lignina no hidrolisado, o que desfavoreceu a produção de bioetanol. Por outro lado, a deslignificação aumentou em 10% o rendimento de etanol em relação à glicose e em 96% em relação ao bagaço.

Duff e Murray (2006) descrevem que hidrólise enzimática deve ser conduzida em condições amenas de pH e de temperatura (pH = 4,8 e temperatura = 45-50 °C) e que não apresenta problemas de corrosão, como observado nas hidrólises com ácidos e/ou com bases, entretanto, para uma eficiente hidrólise enzimática, é necessário primeiramente submeter o material lignocelulósico a um pré-tratamento para remover a lignina e disponibilizar a celulose ao ataque enzimático.

Oliveira, (2011) trabalhando com palha de cana-de-açúcar pré-tratada, através de tratamento ácido diluído, seguido de pré-tratamento básico a uma temperatura de 180 °C, proporcionou em 85% a conversão da fração celulósica através de hidrólise enzimática, chegando a uma concentração máxima de glicose de 46,6 g.L⁻¹.

Oliveira (2008) realizou um pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana a 195 °C por 15 minutos e obteve uma conversão enzimática da celulose em 50%.

Silva (2009) alcançou uma conversão enzimática de 53% quando pré-tratou a palha com ácido sulfúrico diluído 2% (m/v), a 120 °C por 10 minutos, obtendo 26,9 g.L⁻¹ de glicose.

2.8. Processo de fermentação

A fermentação pode ser definida como um processo anaeróbico alternativo utilizado por algumas espécies de microrganismos. Neste processo, os substratos podem ser fermentados em produtos de interesse comercial mediante a ação de microrganismos viáveis. Os açúcares são excelentes substratos fermentáveis, pois produzem intermediários que podem ser reduzidos (HARVEY et al., 2008).

A fermentação alcoólica é uma transformação bioquímica de glicídios a etanol e CO₂ levada a cabo pela célula viva, em particular, por células de leveduras, fungo

amplamente distribuído na natureza e com capacidade de sobrevivência, tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias (PEREIRA JÚNIOR et al., 2009).

O estudo da fermentação da glicose em etanol tem uma grande importância devido o aumento na demanda por este combustível. A utilização de materiais lignocelulósicos para produzir o bioetanol tem sido muito pesquisada nos últimos anos, bem como o estudo de novas leveduras que venham a melhorar o processo fermentativo, dentre elas, na atualidade, uma que tem sido muito utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*.

Yu e Zhang, (2003) a partir do hidrolisado enzimático, obtiveram uma concentração de $15,1 \pm 1,07 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol da fermentação de resíduo de algodão por *Saccharomyces cerevisiae* que continha inicialmente $41,9 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose e o ensaio foi conduzido a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm por 24 h.

Rocha, (2010) trabalhando com bagaço de caju, utilizou um hidrolisado que continha uma concentração inicial de glicose de $52,4 \text{ g.L}^{-1}$, obteve-se uma concentração de etanol de $20,0 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$ com uma produtividade de $3,33 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, a $34 \text{ }^\circ\text{C}$ em 6 h, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Vásquez et al. (2007) estudaram a produção de etanol usando o hidrolisado de *cellulignin G* (bagaço de cana-de-açúcar tratado com hidróxido de sódio a 4% m/v em autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min) por *Saccharomyces cerevisiae* e apresentaram como resultado uma concentração final de etanol de $30,0 \text{ g.L}^{-1}$ e produtividade de $3,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 10 h de fermentação.

Para a fermentação alcoólica existem dois processos bastante utilizados na atualidade: a fermentação e hidrólise separadas (FHS) e a fermentação e sacarificação simultâneas (FSS).

2.8.1. Fermentação e hidrólise separadas (FHS)

O processo de fermentação e hidrólise separadas (FHS) usa estágios diferentes para a produção das enzimas, hidrólise da celulose e fermentação da glicose. A principal vantagem dessa configuração é que todos os três processos podem ser tratados separadamente, minimizando, as interações entre eles. Entretanto, as enzimas celulósicas são inibidas pelo acúmulo de açúcar e ainda são necessários grandes esforços para superar esse problema que impede a obtenção de concentrações razoáveis de etanol, mesmo com altas cargas de enzima (ROSILLO e CALLE, 2005).

2.8.2. Fermentação e sacarificação simultâneas (FSS)

A sequência dos estágios do processo de fermentação e sacarificação simultâneas (FSS) é virtualmente a mesma do processo FHS, exceto pelo fato de fermentação e hidrólise serem combinadas em um mesmo recipiente. A presença de fermento, juntamente com as enzimas, minimiza o acúmulo de açúcar no recipiente. O açúcar produzido durante a decomposição da celulose retarda a ação das enzimas celulósicas e, uma vez que o acúmulo de açúcar é reduzido, com menores cargas de enzimas, são obtidas taxas de produção de etanol mais baixas no processo FSS do que no processo FHS. Uma vantagem é a redução pela metade do número de recipientes usados para a fermentação e a menor vulnerabilidade da mistura à invasão de microrganismos desconhecidos devido à presença do etanol (ROSILLO e CALLE, 2005).

Capítulo III

Metodología

3. Metodologia

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Unidade Acadêmica de Engenharia Química, no Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande, PB.

3.1. Matéria-prima

Utilizou-se as fibras de sisal coletadas no município de Nova Floresta, PB, na fazenda Montevideu. As folhas foram cortadas rentes ao caule (pinha) empilhadas e depois desfibradas em um motor conhecido como motor Paraíba (Figura 3), logo após foram secas ao sol por vários dias.

Figura 3 - Desfibrador de agave



Fonte: Leão et al., (2013)

3.2. Pré-tratamento físico

As amostras de fibra passaram por um processo de secagem na temperatura de 75 °C em estufa de circulação de ar para completar a secagem a campo. A cada 8h as amostras foram pesadas até que a massa permanecesse constante, em seguida, foram moídas em moinho de facas TECNAL MARCONI, Mod-TE 340 (Figura 4) do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB).

Figura 4 - Moinho de facas



Fonte: Leão et al., (2013)

3.2.1. Granulometria

A determinação da distribuição granulométrica foi realizada com um conjunto de peneiras Tyler, com malhas de 14; 20; 24; 35; 42; 48; 65 e 80 mesh. Após a adição de 100 g do resíduo na peneira superior, o conjunto de peneiras foi agitado por 30 minutos na frequência 80 do agitador. O material retido em cada peneira teve sua massa determinada.

O cálculo do diâmetro médio da partícula D foi obtido utilizando a equação de Sauter apresentada por Pereira et al., (2009 b), em que Δx_i representa a fração de mássica retida sobre cada peneira e D_i o diâmetro médio de abertura das peneiras superior e inferior, utilizou-se da Equação 1.

$$D = \frac{1}{\sum_i \frac{\Delta x_i}{D_i}} \quad (1)$$

3.3. Caracterização físico-química

A metodologia utilizada para caracterizar a fibra seca do sisal utilizado nesse trabalho foi baseada nos procedimentos para análise de material lignocelulósico, documento 236 EMBRAPA (MORAIS et al., 2010). Assim, foram determinados o teor de umidade, cinzas, extrativos, lignina, holocelulose, celulose, hemicelulose.

3.4. Caracterização microestrutural e térmica

3.4.1. Difração de raios-x

As análises de DRX foram realizadas em difratômetro Shimadzu, modelo XRD 600 com fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$, tensão de 40 kV e corrente de 30 mA. A velocidade de 2°min^{-1} e faixa de varredura de $2\theta = 10$ a 50° , a amostra foi colocada em um pequeno

cadinho de alumina suspenso ao braço da balança por um fio de platina, permanecendo ali até que toda a massa sofresse oxidação. Para determinação da cristalinidade, utilizou-se da Equação 2.

$$I_c = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \times 100 \quad (2)$$

Em que:

I_c - Índice de cristalinidade

I_{002} - Intensidade do pico no plano cristalino 002 ($2\theta=22,6^\circ$)

I_{am} - Intensidade do pico na fase amorfa ($2\theta=19,0^\circ$)

3.4.2. Microscopia eletrônica de varredura

Primeiro as amostras dos materiais lignocelulósicos foram fixadas com fita adesiva de carbono dupla face condutora convencional em suporte de alumínio (stubs), depois foram metalizadas com uma liga de ouro/paládio de 10 nm em metalizador Quick Coater SC-701 (Sanyu Electron, Tóquio, Japão) e, posteriormente, as amostras foram mantidas em dessecador até o momento da análise.

As microfotografias de MEV foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura (Superscan SSX-550, Shimadzu) com detector OXFORD (elétron secundário) a uma potência do feixe de elétrons de 20 kV (equipamento disponível na Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais – Laboratório de Caracterização Microestrutural II/UAEM/UFCG), utilizando-se o software LEO, versão 3.01. As amostras foram dispostas de forma que fosse possível observar as modificações superficiais das fibras dos materiais.

As microscopias eletrônicas de varredura foram realizadas com ampliação de faixa de 50 a 3.000 vezes, a microscopia foi realizada na fibra in natura e após pré-tratamento.

3.4.3. Estudo térmico

As curvas termogravimétricas (TG) e calorimétricas (DSC) foram obtidas em analisador térmico simultâneo SDT TA Instruments, em atmosfera de nitrogênio, massa de 5 mg, razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ até 1000°C .

3.5. Processos de hidrólise ácida e enzimática da fibra do sisal

Foram realizados processos de hidrólise ácida e hidrólise enzimática com a fibra do sisal.

A hidrólise ácida foi realizada em reator MAITEC forno INTI, Figura 5 (a) com controle de pressão e temperatura.

A hidrólise enzimática foi realizada em reatores descontínuos tipo Erlenmeyer de 250 mL, submetidos a agitação orbital em shaker MARCONI MA-420, a 150 rpm Figura 5 (b).

As análises, tanto para hidrólises ácidas quanto enzimáticas, para determinação do teor de açúcar, álcool e aldeídos (HMF e Furfural) foram determinadas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) equipado com uma bomba modelo ProStar 210 (Varian); Injetor manual com loop de 20 μ L; detector de índice de refração modelo ProStar 356 Varian para os açúcares e álcool etílico e UV/visível 284 nm para os aldeídos; coluna analítica de aço inox Hi-Plex H (30 cm x 7,7 mm; Varian), Figura 5 (c).

As condições da operação foram: temperatura da coluna de 60 °C; fase móvel: água miliQ com vazão de 0,6 mL/min; tempo de análise: de 60 min para teores de açúcares e aldeídos, respectivamente, Soluções padrões interno de açúcares: glicose, xilose, arabinose e sacarose (Sigma 99,99% grau CLAE), 5-hidroximetilfurfural – HMF (Aldrich 99,98%) e furfural (Vetec 99,9 UV/CLAE) foram utilizadas para quantificação dos componentes do licor.

Figura 5. Reator pressurizado (a) Shaker (b) CLAE (c)



(a)



(b)



(c)

3.5.1. Determinação do tempo dos tratamentos ácidos para fibra do sisal.

Foram realizados como testes preliminares um acompanhamento cinético dos tratamentos com H₂SO₄ a 1%, temperatura de 120 °C e proporção fibra moída/ácido de 1:10 (m/v). Os ensaios experimentais foram realizados no reator pelo tempo de até 2h, sendo retiradas alíquotas a cada 15 minutos. As mesmas foram submetidas a análises no CLAE para determinação de açúcares.

3.5.2. Pré-tratamento ácido

O pré-tratamento ácido foi realizado com duas granulometrias de fibra de sisal. Foram pesadas amostras de 10 g da fibra de sisal moída, para cada granulometria a ser avaliadas, colocadas no reator com soluções de ácidos de H₂SO₄ de 1; 2 e 3% na proporção de 1:10 (m/v), a temperaturas de 80; 100 e 120 °C por uma hora, em seguida, o material foi filtrado a vácuo para separar o resíduo do licor.

Como ferramenta para o estudo do pré-tratamento ácido, utilizou-se um planejamento experimental 2² com 2 pontos centrais. As Tabelas 5 e 6 mostram as variáveis de entrada utilizadas no planejamento experimental e a matriz dos experimentos com níveis reais e codificados, respectivamente, do estudo do pré-tratamento.

Tabela 5 - Níveis reais e codificados das variáveis de entrada do planejamento

Variáveis	-1	0	1
Temperatura	80	100	120
Concentração %	1	2	3

Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental das variáveis de entrada no planejamento do pré-tratamento ácido.

Experimentos	Temperatura	Concentração
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0

3.5.3. Pré-tratamento alcalino

Para o pré-tratamento alcalino, 60 g do material foi transferido para o reator pressurizado, em seguida, adicionou-se 600 mL de solução NaOH 4%, a reação ocorreu a temperatura de 120 °C, mantendo-se o tempo constante de 1 hora, em seguida, o material foi filtrado e lavado com água destilada até o pH se igualar ao da água de lavagem, depois, o material foi seco em estufa de circulação forçada a 60 °C até atingir massa constante, (JA'AFARU e FAGADE, 2007).

Do pré-tratamento ácido seguido de básico gerou o material para a hidrólise ácida e hidrólise enzimática.

3.5.4. Hidrólise ácida

A hidrólise ácida foi realizada com as seguintes matérias-primas: resíduo da fibra do sisal do pré-tratamento e resíduo da fibra do sisal do pré-tratamento ácido seguido do básico. Todas as hidrólises foram realizadas em duas granulometrias, segundo o procedimento descrito a seguir.

Os resíduos foram lavados com água destilada e seco em estufa de circulação forçada até peso constante. Depois de seco, esse material foi submetido ao processo de hidrólise no reator com concentrações de ácido de 1; 3 e 5%, 1:10 (m/v) e temperaturas de 120, 150 e 180 °C, em seguida, o material foi filtrado e o licor separado do resíduo para posterior análise de açúcares e furanos (HMF e furfural).

As Tabelas 7 e 8 mostram, respectivamente, os níveis reais e codificados utilizados no planejamento experimental para o estudo do processo de hidrólise e a matriz com os 6 experimentos com os níveis reais e codificados

Tabela 7 - Níveis reais e codificados das variáveis de entrada no Planejamento experimental da hidrólise ácida.

Variáveis	-1	0	1
Temperatura	120	150	180
Concentração%	1	3	5

Tabela 8 - Matriz do planejamento experimental 2² e variáveis de entrada no planejamento da hidrólise.

EXP	Temperatura	Concentração
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0

3.5.5. Hidrólise enzimática

3.5.5.1. Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi baseada na metodologia proposta por Ghose (1987), que mede a atividade celulolítica em termos de unidades de papel de filtro por mililitro da solução enzimática original. Os tubos de ensaios tiveram 50 mg do substrato (Papel de filtro quantitativo de 80 g/m²; cinza 0,00005 g; permeabilidade ao ar: 3 L/s m² e porosidade da maioria dos poros de 8 µm), 1 mL do tampão citrato de sódio (50 mM, pH = 4,8) e 0,5 mL da enzima diluída. Os tubos controles da enzima não tiveram o substrato, bem como os tubos controle do substrato também não continham a enzima. Os tubos padrões de glicose contiveram 0,5 mL da diluição de glicose e 1 mL do tampão. Os tubos foram incubados em banho termostatizado a 50 °C por 60 min. Após o período de incubação, adicionou-se 3 mL do ácido 1-3-5 dinitrossalicílico (DNS) para interromper a reação enzimática. Para dosar os açúcares redutores totais, os tubos foram colocados exatamente por 5 min em banho de água fervente.

A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro da Agilent HP 8453 a 540 nm. Usando a curva de calibração da glicose foi possível determinar a concentração de glicose liberada em cada reação enzimática.

A concentração da enzima foi estimada para exatamente 2 mg de glicose liberada durante a reação enzimática (definição de Filter Paper Unity - FPU), através da equação da reta entre as concentrações de glicose após cada reação e os logaritmos das respectivas diluições da enzima (GHOSE, 1987).

3.5.5.2. Preparação do extrato enzimático utilizado na hidrólise

A preparação enzimática empregada para a sacarificação da fibra do sisal foi composta por 50 mL da enzima Celluclast 1.5 L da Novozyme avolumados a 500 mL em balão volumétrico com tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8.

3.5.5.3. Procedimento de hidrólise enzimática

Na hidrólise enzimática da fibra do sisal foram realizados ensaios com o auxílio de um planejamento fatorial 2^2 verificando-se a influência das variáveis de entrada (carga enzimática e porcentagem de massa seca da fibra do sisal e volume reacional).

A hidrólise foi realizada em erlenmeyers de 250 mL contendo a fibra do sisal seco após pré-tratamento ácido seguido de básico, o extrato enzimático e a solução tampão citrato de sódio (pH 4,8), β -glicosidase e antibiótico (tetraciclina) nas condições do planejamento experimental, mantidas em uma incubadora shaker (modelo SP - 223) sob agitação de 150 rpm e temperatura de 50 °C.

Para cada experimento, foram coletadas amostras em tempos apropriados para o acompanhamento da cinética da hidrólise enzimática e, assim, obter as melhores condições para a obtenção da máxima concentração de glicose.

A Tabela 9 mostra a matriz de planejamento fatorial completo e na Tabela 10 os níveis das variáveis de entrada codificados e reais.

Tabela 9 - Dados da hidrólise enzimática

EXP	Massa de sisal	Vol de extrato (mL)	Vol total (mL)	Vol do tampão (mL)	Tetraciclina (mL)
1	3,00	3,65	150,00	146,35	0,6
2	3,00	9,14	150,00	140,86	0,6
3	3,00	3,65	75,00	71,35	0,3
4	3,00	9,14	75,00	65,86	0,3
5	3,00	6,39	100,00	93,61	0,4
6	3,00	6,39	100,00	93,61	0,4
7	3,00	6,39	100,00	93,61	0,4

A Tabela 10 mostra a matriz de planejamento fatorial completo e na Tabela 11 os níveis das variáveis de entrada codificados e reais.

Tabela - 10 Níveis codificados e reais das variáveis independentes para o planejamento

Variáveis	-1	0	+1
Carga enzimática (FPU/g)	10	17,5	25
Porcentagem massa seca de sisal	2	3	4

Tabela 11 - Matriz de planejamento fatorial 2^2

Exp	Carga enzimática	Porcentagem massa seca de sisal e extrato enzimático
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

3.6. Fermentação

A fermentação do hidrolisado foi realizada na melhor condição da hidrólise enzimática usando a levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* Y904 doada pela CBB Biomassa e Bioprocesso. A mesma foi realizada em um Erlenmeyer com capacidade de 1 L, onde foram colocados 400 mL do hidrolisado, ajustou-se o pH entre 4 e 4,5 e adicionou-se a levedura na concentração de 10 g.L^{-1} acrescido de nutrientes (N, P, K) $0,3\text{g.L}^{-1}$ (NITROFOS cedida pela CBB Biomassa e Bioprocesso), onde o mosto permaneceu sobre agitação constante a 150 rpm, temperatura entre $32 \text{ }^\circ\text{C}$ em equipamento shaker.

Alíquotas de 1,5 mL foram retiradas em tempos pré-estabelecidos para quantificação dos açúcares e contagem da massa celular até que a concentração de glicose permanecesse constante.

3.6.1. Determinação de células por densidade ótica

A determinação da concentração celular, resultante da fermentação, foi realizada por 7 h, pelo método espectrofotométrico, marca PHTONICS BEL SP 2000 UV, pela determinação da absorbância a 610 nm das células ressuspensas em água deionizada após centrifugação a 150 rpm por 15 min. Foram realizadas 3 lavagens e centrifugações para remover açúcares que podem estar misturados na biomassa. Nesta metodologia, a absorbância obtida em cada leitura foi convertida em massa celular por volume do meio, pelo uso de uma curva padrão que relaciona a concentração celular com a absorbância a 610 nm.

3.6.2. Determinação dos parâmetros fermentativos

3.6.2.1. Fator de conversão de glicose em etanol (YP/S)

O fator de conversão foi determinado aplicando a equação 3:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (3)$$

em que:

$Y_{P/S}$ - Fator de conversão de glicose em etanol, g etanol formado/g glicose consumida, g/g^{-1}

P_f e P_i - Concentração final e inicial de produto etanol, g/L^{-1}

S_f e S_i - Concentração final e inicial de produto glicose, g/L^{-1}

3.6.2.2 Produtividade volumétrica em etanol (QP)

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \quad (4)$$

em que:

Q_p - Produtividade volumétrica em produto etanol, (g etanol formado $\cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

Δt - Intervalo de tempo do processo fermentativo, h^{-1}

P_f e P_i - Concentrações final e inicial de etanol, g/L^{-1}

t_i e t_f - Tempos inicial e final de fermentação, h^{-1}

3.6.2.3. Eficiência de conversão η (%)

$$\eta = \frac{YP/Sobtido}{YP/Steórico} \times 100 \quad (5)$$

em que:

η - Eficiência de conversão, %

$YP/S\ obtido$ - Fator de conversão dos açúcares

$YP/S\ teórico$ - Fator 0,511 g etanol/g ART, para o etanol

3.6.2.4. Porcentagem de consumo de glicose (Y%)

$$Y(\%) = \frac{S_i - S_f}{S_i} \times 100 \quad (6)$$

em que:

S_f é a concentração final de açúcar e S_i a concentração inicial de açúcar, g/L^{-1}

3.6.2.5. Cálculo da velocidade específica máxima de crescimento (μ_x)

A fração pela qual a população de microorganismo cresce, na unidade de tempo, é representada por μ , que é a velocidade específica de crescimento equação (7) e tem unidade de tempo ($1/h^{-1}$); na fase exponencial (ou logarítmica), a velocidade específica de crescimento é constante e máxima, sendo μ_x denominado $\mu_{máx}$.

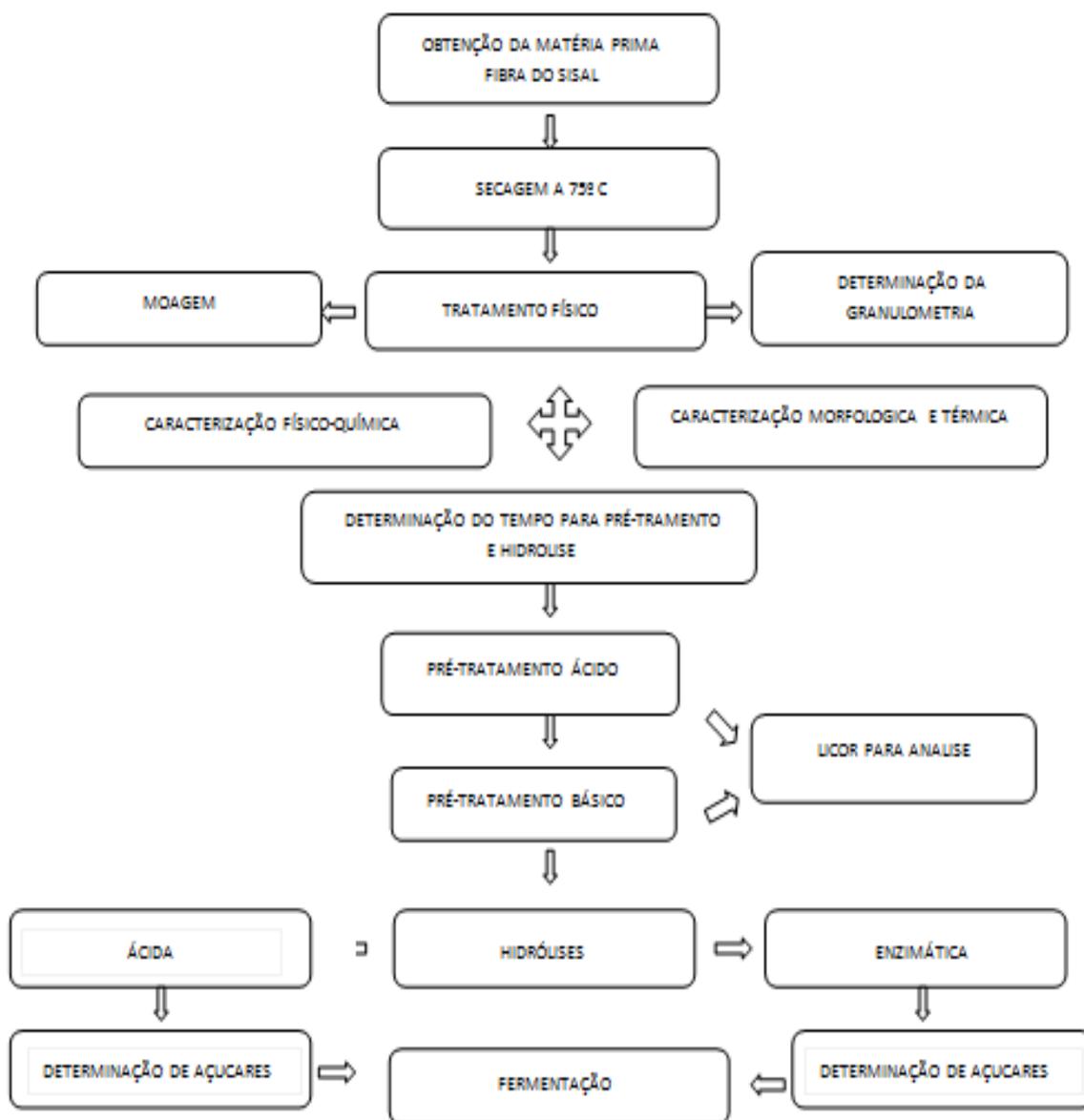
$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (7)$$

O valor de $\mu_{\text{máx}}$ foi obtido plotando-se a curva de crescimento microbiano (\ln_x em função do tempo). Deste modo, observou-se a fase logarítmica na curva e com os pontos que compõem esta fase obteve-se o valor de $\mu_{\text{máx}}$ por meio da regressão linear (Eq. 8); a tangente da reta do gráfico (\ln_x x tempo) é o valor de $\mu_{\text{máx}}$, que indica a velocidade máxima de crescimento celular.

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{\ln(x/x_i)}{(t-t_i)} \quad (8)$$

O processo de obtenção de etanol pode ser resumido no seguinte fluxograma (Figura 6):

Figura 6 - Fluxograma para obtenção de etanol de segunda geração



Capítulo IV

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do material lignocelulósico

Na Tabela 12, tem-se os resultados obtidos para umidade, cinzas, extrativos, lignina, holocelulose, alfa celulose e hemicelulose para a fibra do sisal in natura e pré-tratada, os resultados foram expressos em base seca.

Tabela 12 - Composição química da fibra in natura e pré-tratada

Parâmetros analisados	Fibra in natura (%)	*Fibra pré-tratada (%)
Umidade b.u	5,39 ± 0,28	4,40 ± 0,25
Umidade b.s	5,59 ± 0,32	4,72 ± 0,28
Cinzas	2,40 ± 0,16	2,40 ± 0,18
Extrativos	7,22 ± 0,06	4,55 ± 1,23
Lignina	11,08 ± 0,02	5,64 ± 0,23
Holocelulose	73,61 ± 1,92	89,36 ± 0,15
Alfa Celulose	58,40 ± 0,94	83,03 ± 1,02
Hemicelulose	15,21	6,33

*Fibra de sisal submetida pré-tratamento ácido seguido de básico

É importante verificar que os teores de umidade, extrativos, ligninas e hemicelulose da fibra reduziram com o pré-tratamento, porém, os teores de holocelulose e alfa celulose tiveram um aumento no mesmo material, já os valores para cinzas permaneceram os mesmos para ambos os materiais, conforme Tabela 12. O aumento nesses parâmetros citados é explicável pelo fato de a fibra ter passado pela etapa da deslignificação, a qual visa reduzir ainda mais o conteúdo de lignina e, conseqüentemente, o teor relativo de celulose aumenta, mas não na mesma proporção.

Os valores encontrados nesse trabalho, para cinzas, foram de 2,40%, tanto para a fibra do sisal in natura como para a tratada, os resultados encontrados são próximos aos relatados por Lima et al., (2004) que foram de 2,35%, trabalhando com o bagaço do pedúnculo de caju in natura, valores esses que diferem de Martins et al., (2009) que, trabalhando com fibra de sisal, encontraram valores que variaram de 1 a 2%, o que se assemelha com valores relatados por Banerjee e Pandey (2012) que, trabalhando com bagaço de cana, encontraram 2 a 3% .

Os valores de extrativos foram de 7,22 e 4,55% para o material in natura e para o material pré-tratado, respectivamente, valores esses inferiores aos encontrados em outros materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar 9,38 % (CANILHA et al., 2010), cladódios da palma forrageira 7,9% (PRADO, 2010), palha de trigo 9,8% (SILVA, 2011). O baixo teor de extrativos encontrados na fibra de sisal pode ser atribuído aos pré-tratamentos aos quais a fibra foi submetida, bem como das lavagens após cada tratamento, visto que os extrativos são compostos por taninos, óleos essenciais, pectinas, proteínas, fenólicos e açúcares simples presentes no material que podem ser extraídos pelo ácido sulfúrico e pelo hidróxido de sódio utilizados nos pré-tratamentos.

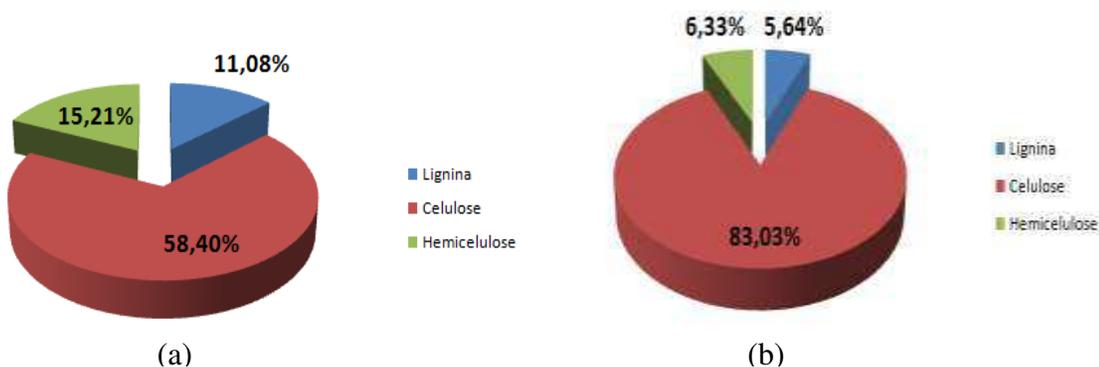
Para α -celulose, lignina e hemicelulose os valores encontrados neste trabalho para a fibra in natura foram de 58,40, 11,08 e 15,21%. Após o pré-tratamento, foi de 83,03; 5,64 e 6,3%, um aumento de 48,5% para celulose e uma redução de 58,38% para lignina e 49,09%. Para hemicelulose, o que difere dos valores encontrados por Wanderley, (2012) trabalhando com bagaço de cana para produção de etanol de 2ª geração que apresentou um aumento de 74,98% para celulose, enquanto a lignina diminuiu 83,35% em relação ao bagaço pré-tratado. Os valores encontrados pela autora no bagaço não deslignificado foi de 49,66% para celulose, 7,94% para hemicelulose e 34,95% para lignina, após o pré-tratamento, obteve-se os seguintes valores: 87,29% para celulose, 6,88% para hemicelulose e 5,68% para lignina, valores esses que diferem da fibra pré-tratada deste trabalho.

Corredor et al., (2008) estudando a palha de trigo como matéria-prima para produção de bioetanol, obtiveram, após pré-tratamento ácido seguido de básico, 36; 12,5 e 8,2% de celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente, Canilha et al., (2010) trabalhando com a mesma biomassa e o mesmo pré-tratamento que Corredor et al., (2008) verificaram teores de 31, 26 e 9%, respectivamente, valores inferiores ao encontrado para a fibra do sisal. Verifica-se que esta diferença em suas composições, em relação aos valores apresentados neste trabalho, é devido, provavelmente, à formação estrutural do vegetal durante o crescimento e o tipo de biomassa e também que os pré-tratamentos aplicados têm efeitos diferentes para cada tipo de material lignocelulósico.

A redução de lignina e hemicelulose (Figura 7), em relação ao material lignocelulósico pré-tratado, pode refletir em uma melhora na conversão de celulose em

glicose já que tanto a hemicelulose quanto a lignina formam uma camada protetora ao redor da celulose, reduzindo a eficiência do ataque de ácidos ou enzimas.

Figura 7 - Composição da fibra do sisal: (a) in natura e (b) pré-tratado

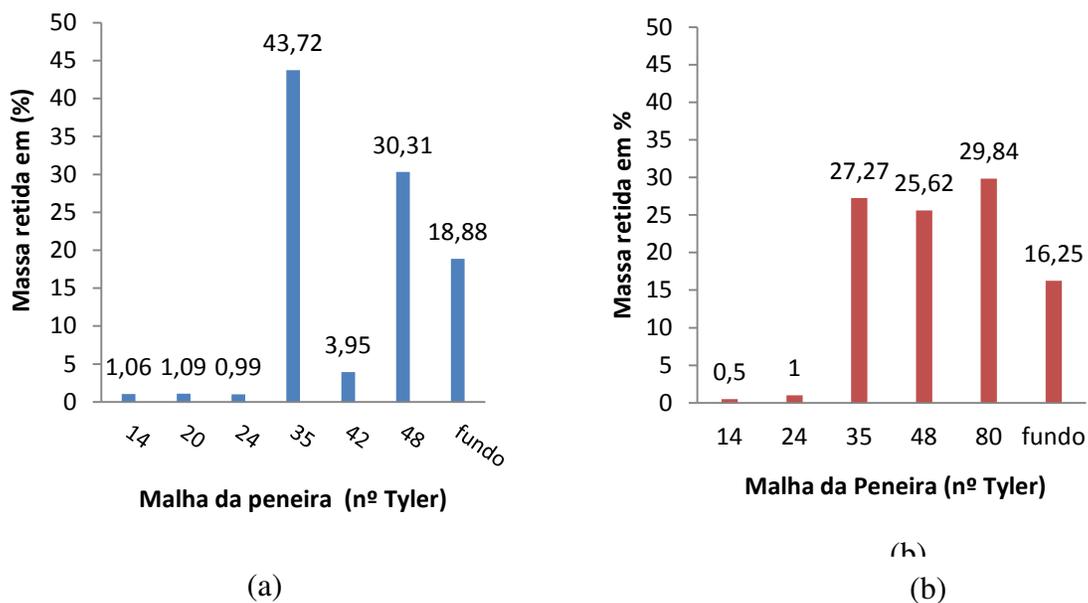


Os resultados da caracterização físico-química corroboram com os dados descritos na Tabela 12, ou seja, o pré-tratamento com ácido seguido de básico, tem a vantagem de remover grande parte da lignina, solubilizar a hemicelulose e concentrar a celulose.

4.2. Granulometria

Após moagem e peneiramento da fibra do sisal, foram coletadas amostras com duas distribuições granulométricas diferentes, conforme pode ser verificado nas Figuras 8 (a), (b)

Figura 8 - Distribuição granulométrica de menor partícula (a) e de maior partícula (b)



Aplicando a equação de Sauter, obteve-se um diâmetro médio de 0,21 mm e 0,49 mm para menores e maiores partículas de fibra de sisal, respectivamente

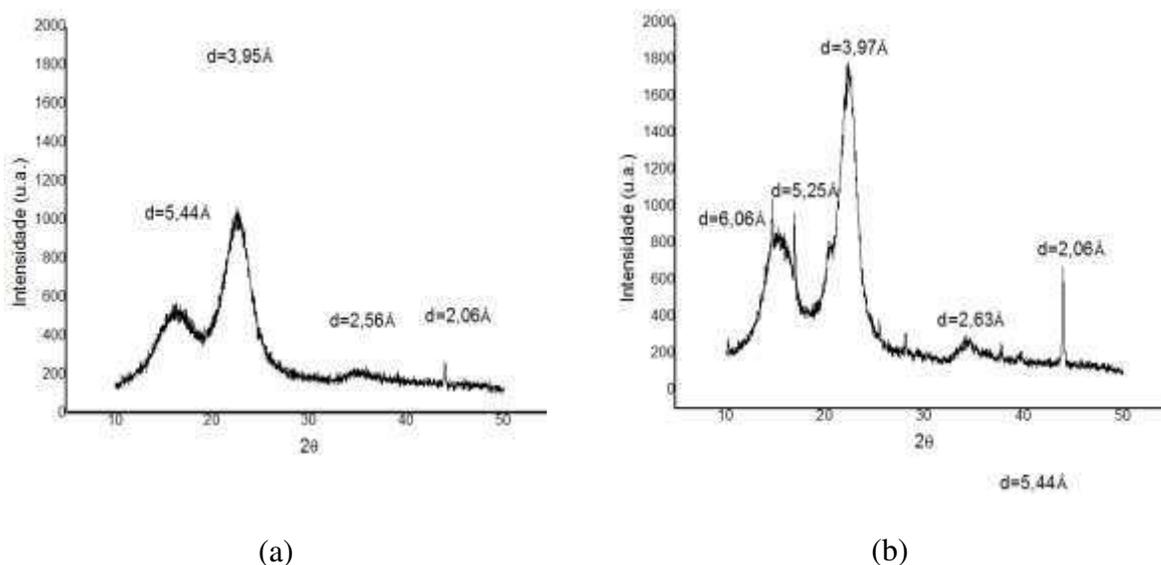
Esses materiais com diâmetro médio diferente foram submetidos separadamente aos processos de pré-tratamentos e submetidos à hidrólise ácida e enzimática.

Segundo Riveres et al., (2007) os pré-tratamentos físicos também podem ser utilizados para aumentar a reatividade do material lignocelulósico frente às enzimas hidrolíticas, bem como a processos de hidrólises ácidas. Por exemplo, a moagem do material bruto (redução da granulometria) pode aumentar significativamente a área superficial e também diminuir a cristalinidade da celulose, favorecendo o processo de hidrólise, embora esse procedimento aumenta o gasto de energia o que pode desfavorecer a sua aplicação.

4.3. Determinação da cristalinidade da fibra de sisal por difração de raios X (DRX)

A partir dos resultados das análises de difração de raios X da fibra de sisal in natura e com pré-tratamento ácido seguido de básico (Figura 9 (a), (b) e Tabela 13), foram obtidos os valores de índice de cristalinidade para cada material a partir da equação 8.

Figura 9. Difratogramas (a) fibra in natura (b) *fibra pré-tratada



*Fibra de sisal submetida a pré-tratamento ácido seguido de básico

Observa-se uma melhor definição nos picos da amostra pré-tratada e um aumento de intensidade. Segundo Zhao et al., (2009) isso ocorreu devido a remoção da lignina e da

hemicelulose as quais são estruturas amorfas e que expõem a celulose e conseqüentemente um aumento de cristalinidade da amostra, a grande maioria dos pré-tratamentos mostram que o índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos são evidenciados após as etapas de pré-tratamento.

Tabela 13 - Cristalinidade da fibra do sisal in natura e pré-tratada

	Cristalinidade (%)
Fibra in natura	58,4
*Fibra pré-tratada	74,2

*pré-tratamento ácido seguido de básico

A não diminuição da cristalinidade indica que o processo não levou a degradação de cadeias de celulose (TRINDADE, 2005).

Esse aumento da cristalinidade já havia sido observado em outros materiais lignocelulosicos como o bagaço de cana, palha de arroz e sorgo sacarino, uma vez que a remoção de grande parte da lignina e das hemiceluloses, porção amorfa das fibras, permite um melhor empacotamento das cadeias de celulose (SIQUEIRA, 2006).

4.4. Análise morfológica da fibra do sisal por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

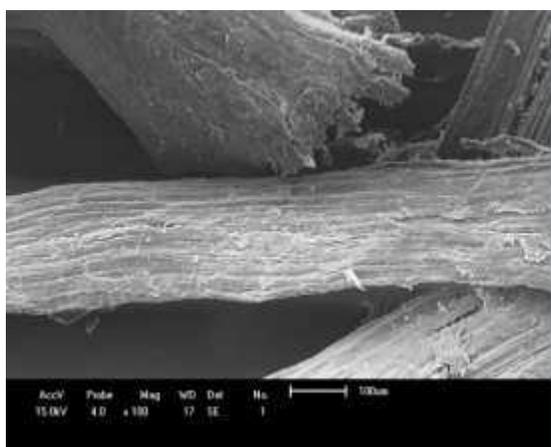
As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciam as mudanças na estrutura física da fibra do sisal com pré-tratamento ácido seguido de básico. Essas etapas têm como alvo, alterar a estrutura natural das fibras lignocelulósicas facilitando a ação dos catalisadores (DE PAULA et al., 2008).

Fazendo uma análise comparativa das fotomicrografias da fibra in natura observa-se uma mudança da estrutura morfológica da fibra do sisal quando submetida aos processos de pré-tratamento.

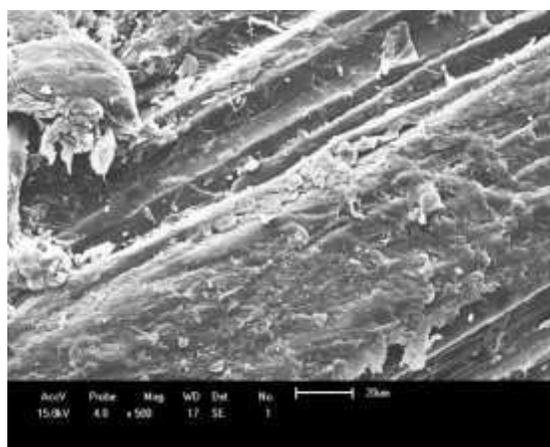
Na Figura 10 (a, b, c, d) é apresentada a estrutura física da fibra do sisal, sem nenhum pré-tratamento. Observa-se um entrelaçamento tridimensional das fibras do material lignocelulósico cobertas por uma camada opaca (extrativos). Comportamento semelhante foi verificado por Rocha (2010) ao observar que esta camada era formada, possivelmente, por ceras, ao estudar a estrutura física do bagaço de caju.

Na Figura 11 (e, f, g, h) observa-se que depois do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído 3 % a 120 °C por 1 hora e com NaOH a 4 % também por 1 h, que a camada mais externa das fibras foi removida tornando-se visível a estrutura fibrilar interna aumentando sua porosidade mostrando que a etapa de pré-tratamento pode proporcionar uma melhor disponibilidade das fibras celulósicas para processos subsequentes, tais como a hidrólise ácida ou enzimática da celulose em glicose, no processo de obtenção de etanol celulósico. As fotomicrografias (Figura 10 e 11) corroboram com as análises químicas, as quais evidenciam uma grande solubilização dos componentes, tornando as fibras mais expostas a cada etapa de processamento da biomassa e com isso aumentando sua área superficial.

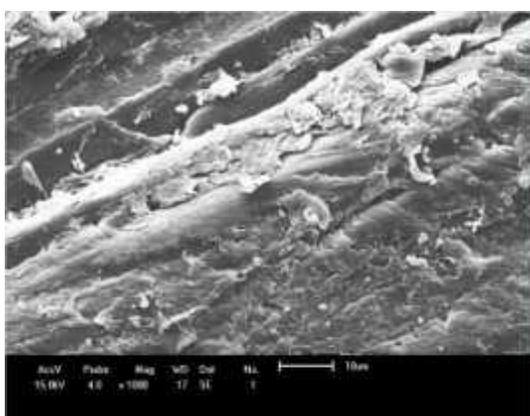
Figura 10 - Micrografias da fibra de sisal in natura (a)100x, (b) 500x, (c)1000x, (d) 3000x



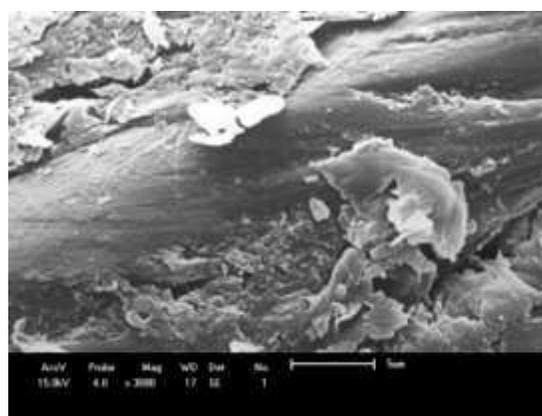
(a)



(b)

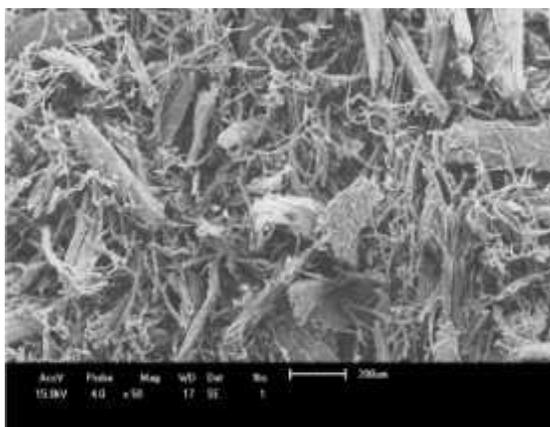


(c)

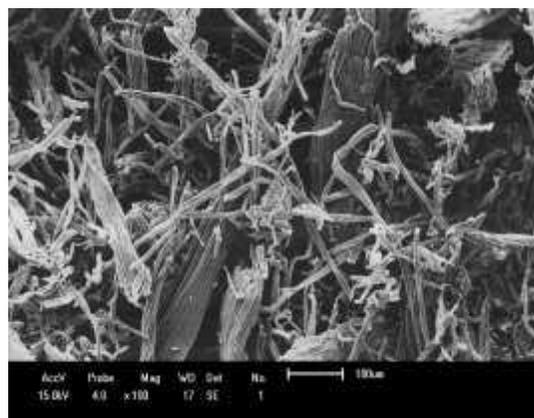


(d)

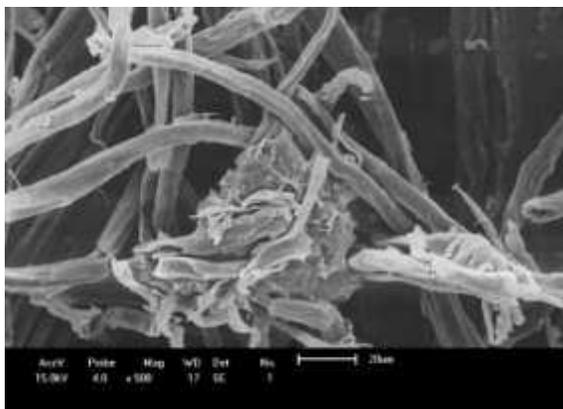
Figura 11 - Micrografias da Fibra do sisal pré-tratada (e) 50x, (f) 100x, (g) 500x, (h) 3000x



(e)



(f)



(g)



(h)

4.5. Caracterização térmica

As curvas termogravimétricas (TG/DTG) da fibra de sisal in natura (Figura 12) apresentaram quatro etapas de perda de massa, restando 9% de cinzas. A primeira etapa, atribuída à desidratação, ocorreu no intervalo de temperatura de 25 a 100 °C indicando 8% de perda de massa. A segunda etapa, atribuída à decomposição da hemicelulose e celulose, ocorreu no intervalo de temperatura de 190 a 400 °C indicando 60% de perda de massa. A terceira e quarta etapas, atribuídas à decomposição da celulose e lignina, ocorreram nos intervalos de temperatura de 401 a 650 °C e 651 a 1000 °C indicando 12 e 11% de perdas de massa, respectivamente.

Figura 12 - Curvas TG/DTG da fibra de sisal in natura

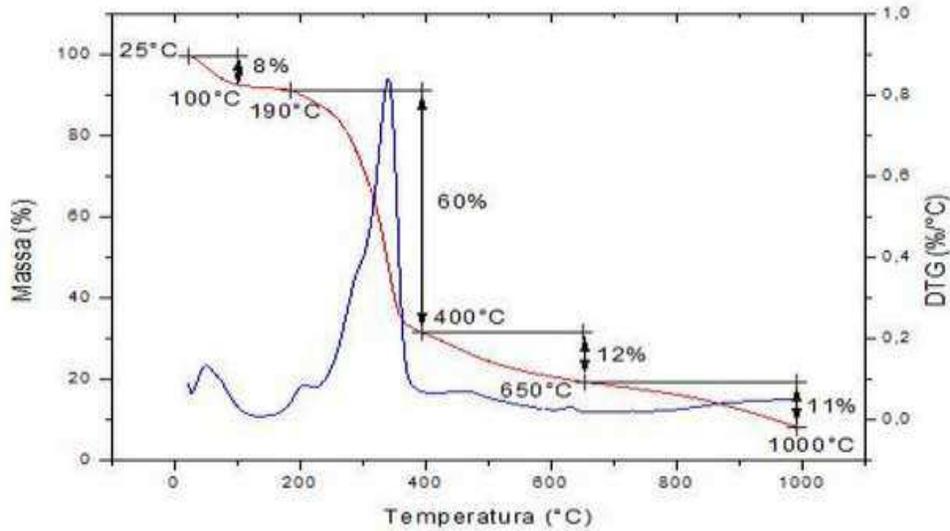


Tabela 14 – Dados obtidos nas curvas TG/DTG da fibra de sisal in natura

Amostra	Etapas	TG/DTG faixa de temp. (°C)	Atribuições
Fibra in natura	1	25 a 100 °	Desidratação 8% de perda de massa
	2	190 a 400 °	Decomposição da hemicelulose e celulose 60% de perda de massa
	3	401 a 650 °	Decomposição da celulose 12% de perda de massa
	4	651 a 1000°	Decomposição da lignina 11% de perda de massa.

A curva DSC da fibra de sisal in natura apresentou três transições endotérmicas, a primeira associada à desidratação no intervalo de temperatura de 25-200 °C; a segunda referente a decomposição de hemicelulose de 370-480 °C e a terceira referente a decomposição de celulose e lignina no intervalo de 481-1000 °C (Figura 13).

Figura 13 - Curva DSC fibra de sisal in natura

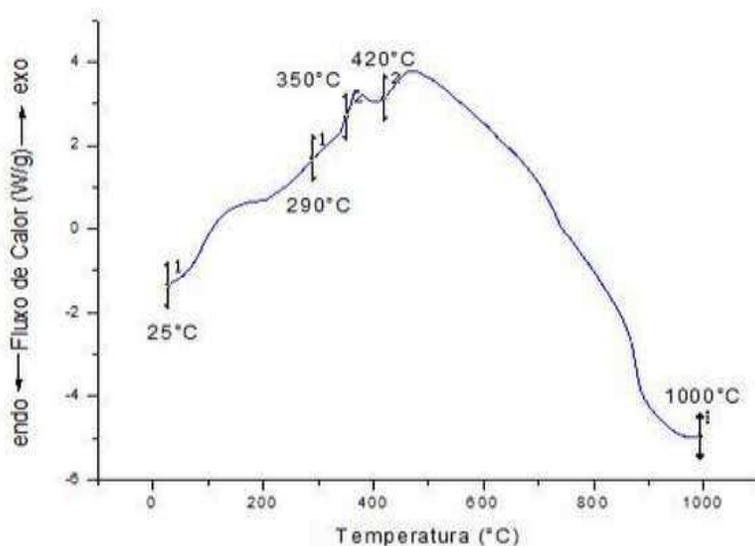


Tabela 15 - Dados obtidos nas curvas DSC da fibra de sisal in natura

Amostra	Transições	Temp. (°C)	Atribuições
Fibra in natura	1	25 a 200	Endotérmica associada a desidratação.
	2	370 a 480	Endotérmica referente a decomposição da hemicelulose.
	3	481 a 1000	Endotérmica decomposição da celulose e lignina

As curvas termogravimétricas (TG/DTG) da fibra de sisal tratada (Figura 14) apresentaram três etapas de perda de massa, restando 12% de cinzas. A primeira etapa, atribuída à desidratação, ocorreu no intervalo de temperatura de 25 a 100 °C indicando 7% de perda de massa. A segunda etapa, atribuída à decomposição da hemicelulose e celulose, ocorreu no intervalo de temperatura de 200 a 390 °C indicando 68% de perda de massa. A terceira etapa, atribuída à decomposição da celulose e lignina, ocorreu no intervalo de temperatura de 391 a 1000 °C indicando 13% de perda de massa.

Figura 14. Curvas TG/DTG da fibra de sisal pré-tratada

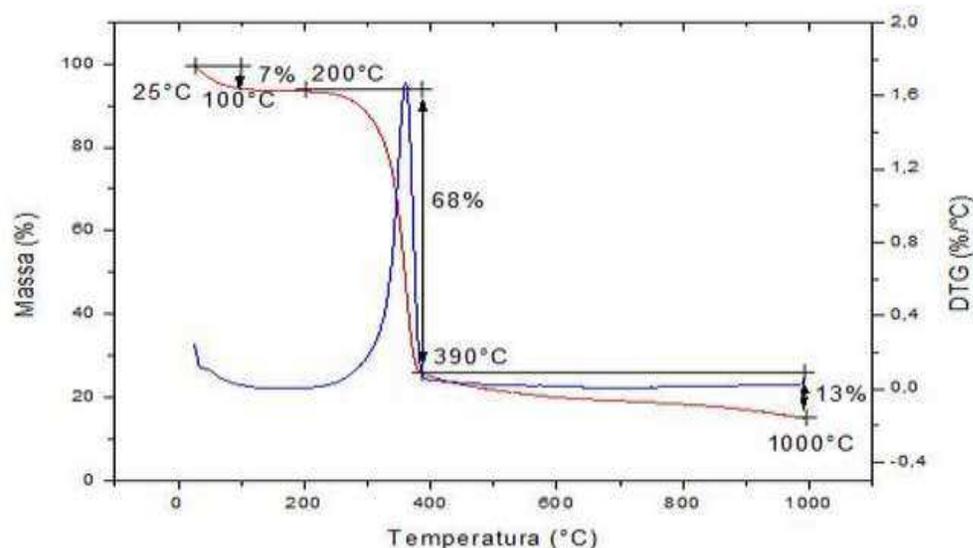


Tabela 16 - Dados obtidos nas curvas TG/DTG da fibra de sisal pré-tratada

Amostra	Etapa	TG/DTG faixa de temp. (°C)	Atribuições
Fibra Pré-tratada	1	25 a 100	Desidratação 7 % de perda de massa
	2	200 a 390	Decomposição da hemicelulose e celulose 68% de perda de massa
	3	391 a 1000	Decomposição da celulose e lignina 13% de perda de massa

A curva DSC da fibra de sisal tratada apresentou três transições endotérmicas, a primeira associada à desidratação no intervalo de temperatura de 25-300 °C; a segunda e terceira referentes a decomposição de hemicelulose, celulose e lignina nos intervalos de 301-400 °C e 401-1000 °C (Figura 15).

Figura 15. Curva DSC da fibra de sisal pré-tratada

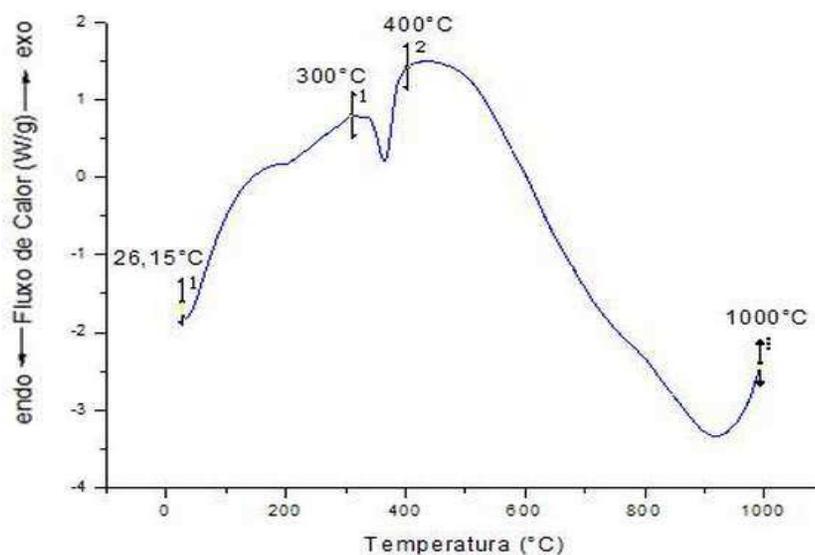


Tabela 17 - Dados obtidos nas curvas DSC da fibra de sisal pré-tratada

Amostra	Transições	Temp. (°C)	Atribuições
Fibra Pré-tratada	1	26 a 300	Endotérmica associada a desidratação.
	2	300 a 400	Endotérmica referente a decomposição da hemicelulose.
	3	401 a 1000	Endotérmica decomposição da celulose e lignina.

Através dos dados térmicos verifica-se que o tratamento realizado na fibra de sisal alterou o perfil térmico em relação ao número de etapas na curva termogravimétrica da Fibra tratada com redução da temperatura máxima de decomposição da segunda etapa de perda de massa e inversão da segunda transição na curva calorimétrica da fibra tratada devido à redução dos teores de hemicelulose e lignina provocada pelo tratamento realizado.

4.6.Determinação do tempo dos tratamentos ácidos para fibra do sisal

O acompanhamento cinético foi realizado para o pré-tratamento e hidrólise (Figuras 16-17).

Figura 16 - Acompanhamento cinético para o tempo dos pré-tratamentos

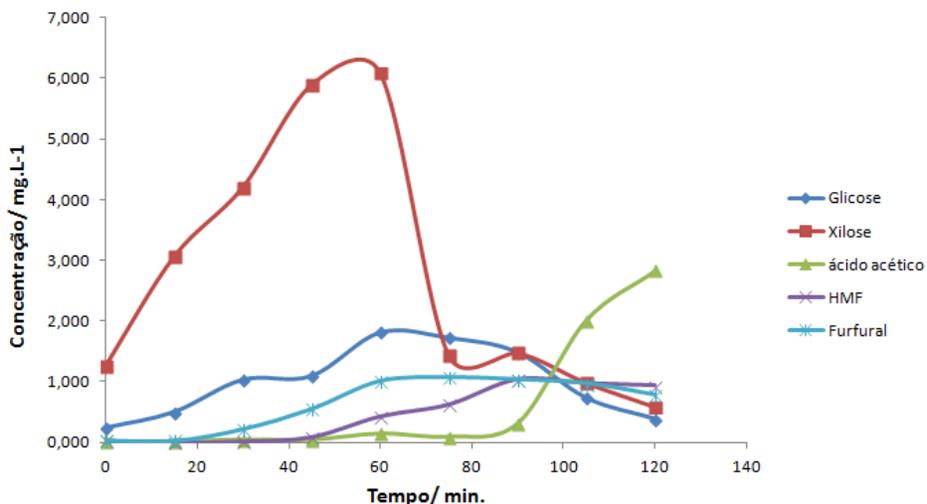
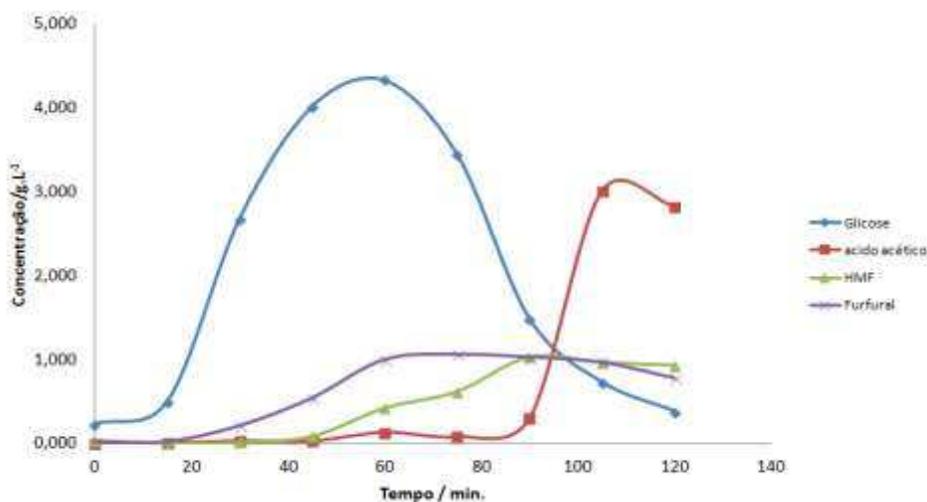


Figura 17 - Acompanhamento cinético para o tempo de hidrólise



Para a determinação do tempo ideal para o pré-tratamento ácido levou-se em consideração a quantificação da xilose o que foi observado no tempo de 1h. Para a hidrólise ácida foi observada a concentração de glicose no hidrolisado o que ocorreu também no tempo de 1h, após esse tempo foi verificada reduções da xilose no pré-tratamento e da glicose no processo de hidrólise. Observou-se a formação de inibidores, porém a quantificação desses inibidores como: ácido acético, HMF e furfural, foram muito baixos não chegando a comprometer nenhum dos processos.

No presente trabalho fixamos o tempo em 1h, visto que a finalidade do pré-tratamento é remover ao máximo a xilose que age como inibidor no processo fermentativo, já a hidrólise tem por objetivo obter a maior concentração de glicose no licor para posterior fermentação. Segundo Vancov et al., (2012) a determinação do tempo de processos que envolva concentração de ácidos e temperaturas visando a fermentação para produção de álcool, deve ser observada para que se possa evitar a degradação dos açúcares presente nos materiais lignocelulósico e desta forma e evitar a formação de inibidores e otimizar os processos, outro ponto importante é que para cada material esse tempo pode variar de acordo com sua composição, sendo necessário teste preliminares.

4.7. Pré-tratamento ácido

Para o pré-tratamento ácido foi utilizado um planejamento experimental 2^2 com 2 pontos centrais, com duas granulometrias 0,21 mm e 0,49 mm.

4.7.1. Pré-tratamento ácido para maior granulometria

A Tabela 18 apresenta os resultados da concentração da xilose quando são avaliados sobre a produção da mesma os efeitos da temperatura e da concentração do ácido sulfúrico.

Tabela 18 - Matriz de planeja pré-hidrólise ácida fibra in natura maior granulometria (0,49 mm)

EXP		T (°C)		C (%)	Xilose
1	-1	80	-1	1	4.585,12
2	-1	120	1	1	845,65
3	1	80	-1	3	1.015,74
4	1	120	1	3	13.144,84
5	0	100	0	2	3.619,34
6	0	100	0	2	3.288,94

Observa-se por meio dos dados experimentais que o maior valor da concentração de xilose foi de $13.144,84 \pm 43,06 \text{ mg.L}^{-1}$ em $120 \text{ }^\circ\text{C}$ e C de 3% .

O diagrama de Pareto é apresentado na Figura 18. Para a pré-hidrólise a T $^\circ\text{C}$, C% bem como a interação entre essas variáveis influenciam aumentando a concentração de xilose. Os dados foram analisados em nível estatístico de 95% de confiança apresentando um coeficiente de determinação de 97% (Tabela 19).

Figura18 - Diagrama de Pareto para pré-hidrólise ácida com maior granulometria (0,49mm)

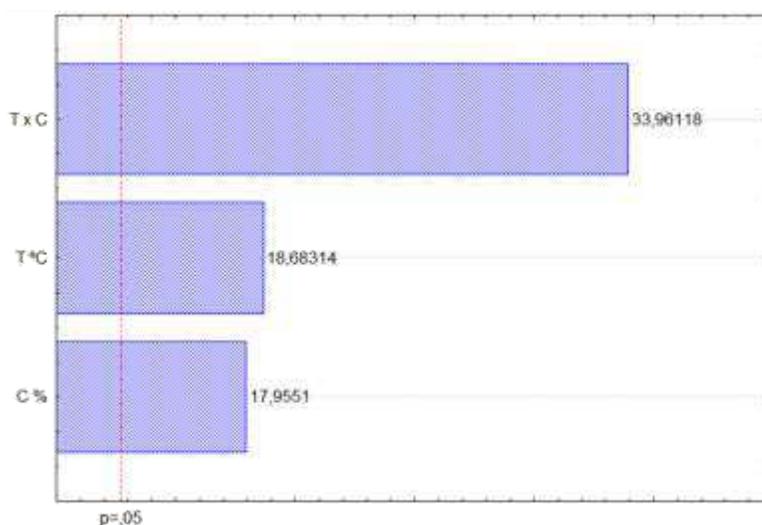


Tabela 19 - Análise de variância (ANOVA) para pré-hidrólise ácida com maior granulometria.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	99601644	3	33200548	1,22
Resíduo	2833599	2	1416799,5	
Total	1024352243	5		
% R ²	97			

$F_{\text{tabelado}} = 19,164$ $F_{\text{calculado}} = 23,43$

GL – grau de liberdade; SQ - soma dos quadrados; MQ. – média quadrática dos desvios
Teste F - ($F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}}$)

Por meio do teste F, de valor igual a 1,22 e portanto significativo, pode-se afirmar que a T e C% influenciaram positivamente na produção de xilose, ou seja aumentando a T e

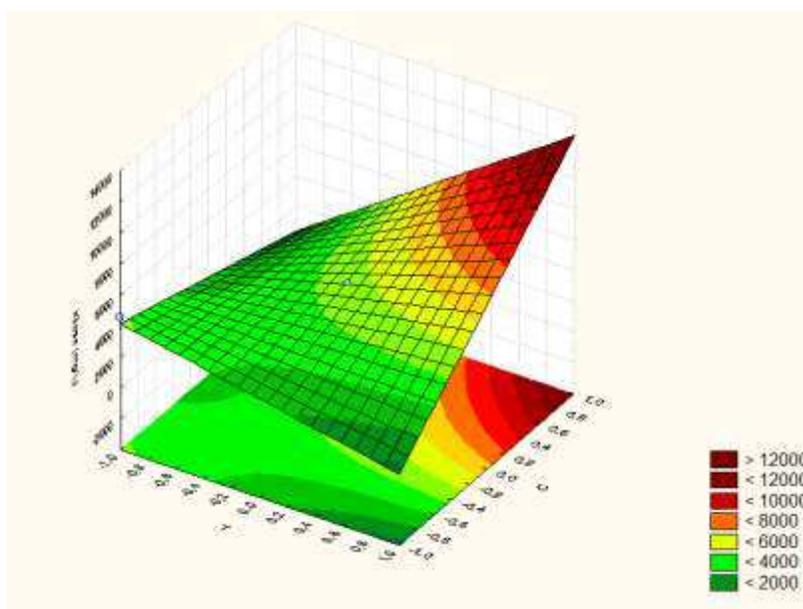
C% de ácido ocorre um aumento na concentração de xilose. Box et al., (1978) diz que para valores de F maior que 1,00 o modelo estatístico é considerado significativo.

O modelo estatístico codificado com as variáveis significativa é apresentado na Equação 9:

$$\text{Xilose (mg.L}^{-1}\text{)} = 4416,605 + 2182,4525.T + 2097,4075.C + 3967,1425.C.T \quad (9)$$

A Figura 19 apresenta a superfície de resposta para a variável concentração de xilose do licor pré-hidrolisado da fibra do sisal na maior granulometria. Observa-se que nos intervalos estudados as maiores concentrações de xilose para uma maior granulometria estudada da fibra de sisal ocorrem para níveis mais altos de temperatura e concentração.

Figura 19 - Superfície de resposta para pré-hidrólise ácida com maior granulometria



4.7.2. Pré-tratamento ácido para menor granulometria

A Tabela 20 apresenta os resultados da concentração da xilose quando são avaliados os efeitos da temperatura e da concentração do ácido sulfúrico sobre a produção da mesma.

Tabela 20 - Matriz de planejamento do pré-tratamento ácido da fibra in natura menor granulometria (0,21mm).

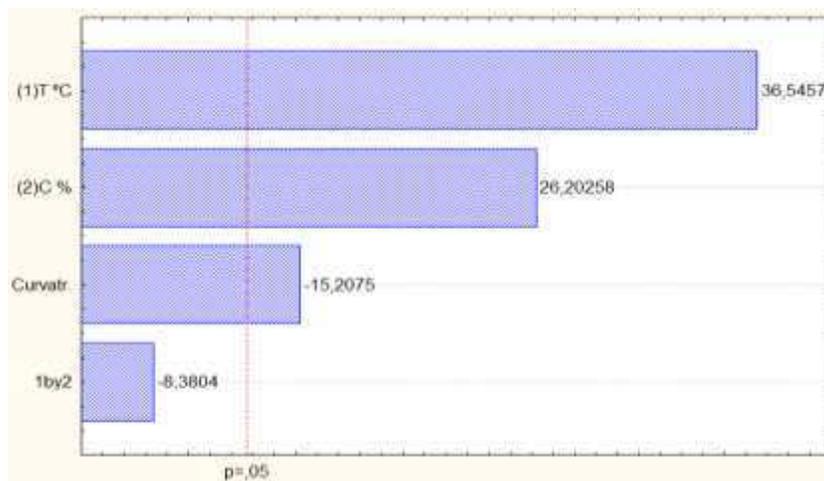
Exp	T (°C)	C (%)	Xilose		
1	-1	80	-1	1	2229,35
2	1	120	-1	1	8904,52
3	-1	80	1	3	10900,94
4	1	120	1	3	14340,96
5	0	100	0	2	6688,35
6	0	100	0	2	6415,38

A maior concentração de xilose para a menor granulometria da fibra de sisal estudada foi de $14.340,96 \pm 43,0 \text{ mg.L}^{-1}$ obtida para a maior temperatura $120 \text{ }^\circ\text{C}$ e maior concentração de ácido 3%. O valor da concentração dessa pentose foi maior do que o obtido para o de maior granulometria.

O estudo estatístico para o planejamento fatorial linear (com interação) mostrou que para um nível de 95% de confiança as variáveis estudadas não ofereceram efeito para a concentração da xilose, apresentando um coeficiente de determinação de 78%.

A Figura 20 apresenta o gráfico de Pareto para as variáveis estudadas e o mesmo indica que uma ampliação dos níveis estudados deve ser realizada, uma vez que a variável curvatura é significativa, bem como concentração de ácido e temperatura a um nível de 95%, gerando uma qualidade coeficiente de determinação de 99,96%.

Figura 20 -Diagrama de Pareto do pré-tratamento ácido na menor granulometria (0,21mm).



O tratamento ácido teve a finalidade de remover a maior quantidade de hemicelulose e xilose, podemos observar que o experimento 4 com concentração de 3% H_2SO_4 á 120 °C por uma hora teve efeito significativo para ambas as granulometrias, sendo que a de menor granulometria obteve melhor resposta para xilose, que é uma pentose contida na hemicelulose que é hidrolisada no processo de hidrólise ácida, sendo que esse pré-tratamento é utilizado para hidrólise com ácido diluído e foi preparatória para o tratamento básico que será utilizado para hidrólise enzimática.

Embora o processo empregado tenha solubilizado parte da celulose, devido à severidade do processo empregado, o alto conteúdo da mesma indica alto potencial para a conversão pela rota de sacarificação (ROCHA et al., 2010). A obtenção da celulignina após o pré-tratamento ácido da fibra do sisal é importante passo na sacarificação da biomassa, dado que grande parte da hemicelulose foi solubilizada e que esta remoção facilita o acesso das enzimas celulolíticas às microfibrilas de celulose, resultando em maior obtenção de açúcares e, conseqüentemente, maior produção de etanol por meio da fermentação dos açúcares obtidos (ALVIRA et al., 2010).

4.7.3. Tratamento ácido seguido de básico

O tratamento ácido seguido de básico tem a finalidade de remover a maior quantidade de lignina e disponibilizar a celulose para as hidrólises tanto ácida como enzimática, pois a mesma funciona como inibidor no processo fermentativo.

Para o tratamento básico foi utilizada o resíduo da melhor condição do tratamento ácido, no qual se realizou o procedimento descrito anteriormente.

Fica evidente que os pré-tratamentos promovem o enriquecimento do teor de celulose em comparação a fibra in natura. Pode-se observar que o pré-tratamento ácido seguido de alcalino 4% resultou em um sólido com maior teor de celulose dentre os pré-tratamentos avaliados, indicando que a hemicelulose e lignina foram majoritariamente retiradas da fase sólida. Entretanto, tem a vantagem de não ser rigorosa o suficiente para que ocorra a quebra da celulose e perda da glicose nas frações líquidas, além de reduzir a cristalização da celulose e aumentar a porosidade do material lignocelulósico, sem grande formação de compostos inibidores de fermentação, assim aumentar a exposição da celulose aos processos de hidrólise. A soma da glicose perdida nos pré-tratamentos ácido e alcalino

aplicados neste trabalho representa aproximadamente 0,8% da glicose obtida após a hidrólise enzimática, valor de perda aceitável do ponto de vista industrial.

Os resultados obtidos neste tratamento podem ser observados na Figura 3, na qual se podem ver as modificações na composição do material lignocelulósico.

4.8. Hidrólise ácida

Para a hidrólise ácida com maior e menor granulometria, foi utilizado um planejamento experimental fatorial 2^2 com 2 pontos centrais.

4.8.1. Hidrólise ácida para maior granulometria e menor granulometria

A Tabela 21 apresenta os resultados da concentração da glicose quando são avaliados sobre a produção da mesma os efeitos da temperatura e da concentração do ácido sulfúrico.

Tabela 21 - Matriz de planejamento para hidrólise ácida com maior granulometria (0,49 mm)

EX	T (° C)		C (%)		Glicose
1	-1	120	-1	3	1247,24
2	1	180	-1	3	2270,95
3	-1	120	1	5	1498,05
4	1	180	1	5	6233,30
5	0	150	0	4	2397,22
6	0	150	0	4	2154,01

Observa-se, por meio dos dados experimentais, que o maior valor da concentração de glicose foi de 6.233,30 mg.L⁻¹ em 180 °C e concentração de 5% .

O diagrama de Pareto é apresentado na Figura 21. Para a hidrólise, a T °C, C%, bem como a interação entre essas variáveis, influenciam aumentando a concentração de glicose. Os dados foram analisados em nível estatístico de 94 % de confiança, apresentando um coeficiente de determinação de 97% (Tabela 22).

Figura 21 - Diagrama de Pareto da hidrólise ácida com maior granulometria (0,49 mm)



Tabela 22 - Análise de variância (ANOVA) para o licor hidrolisado com maior granulometria.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	16172966	3	5390988,67	1,36
Resíduo	413739	2	2206869	
Total	16586705	5		
% R²	97			

$$F_{\text{calculado}} = 26,06 \quad F_{\text{tabelado}} = 19,164$$

GL – grau de liberdade; SQ - soma dos quadrados; MQ. – média quadrática dos desvios
 Teste F - (Fcalculado / Ftabelado)

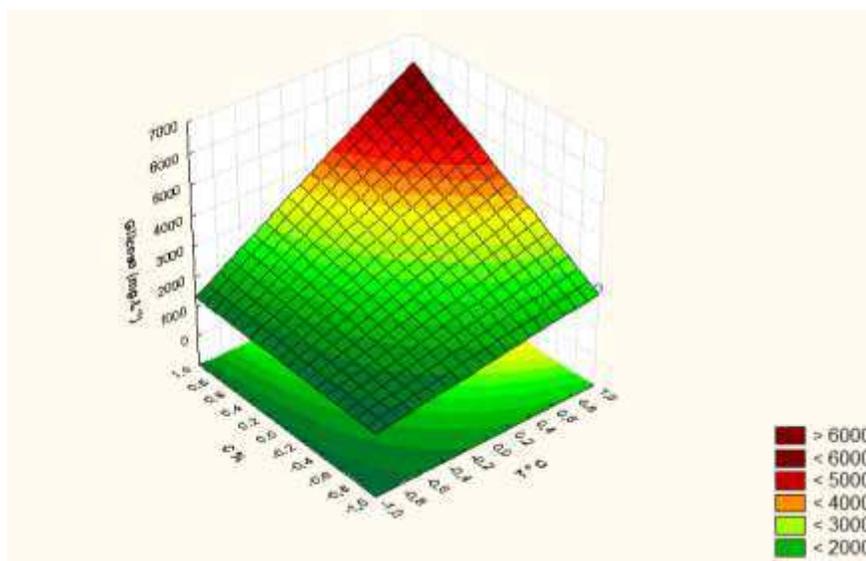
Por meio do teste F, de valor igual a 1,36 e, portanto, significativo, pode-se afirmar que a T e C% influenciaram positivamente na produção de glicose, ou seja, aumentando a T °C e C% de ácido, ocorre um aumento na concentração de glicose. Box et al., (1978) dizem que, para valores de F maior que 1,00, o modelo estatístico é considerado significativo.

O modelo estatístico codificado com as variáveis significativas é apresentado na Equação 10:

$$\text{Glicose (mg.L}^{-1}\text{)} = 2633,5 + 1439,7.T + 1053,3.C + 927,9.T.C \quad (10)$$

A Figura 22 apresenta a superfície de resposta para a variável concentração de glicose do licor pré-hidrolisado da fibra do sisal na maior granulometria. Observa-se que, nos intervalos estudados, as maiores concentrações de glicose para uma maior granulometria estudada da fibra de sisal ocorrem para níveis mais altos de temperatura e concentração.

Figura 22- Superfície de resposta para hidrólise ácida com maior granulometria (0,49 mm)



Para a hidrólise ácida com menor granulometria foi utilizado um planejamento experimental 2^2 com 2 pontos centrais.

A Tabela 23 apresenta os resultados da concentração de glicose quando são avaliados os efeitos da temperatura e da concentração do ácido sulfúrico sobre a produção da mesma

Tabela 23 - Matriz de planejamento para a hidrólise ácida com menor granulometria (0,21 mm)

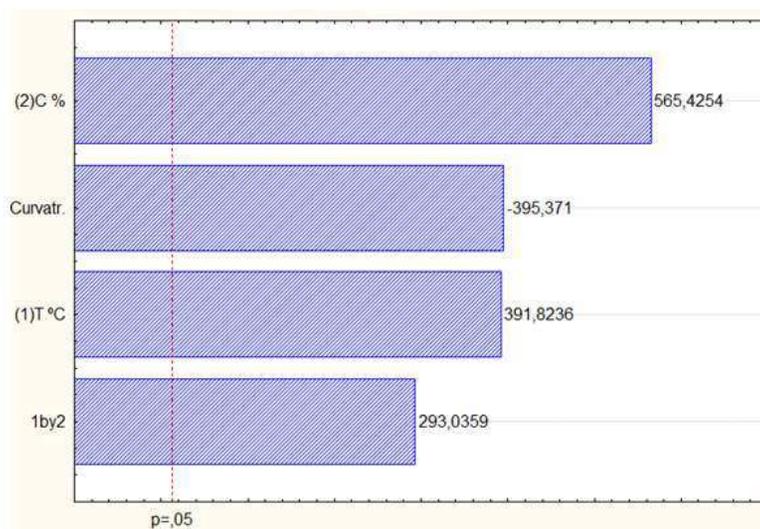
EX		T (°C)		C (%)	Glicose
1	-1	120	-1	1	2280,34
2	1	180	-1	1	3720,02
3	-1	120	1	5	6250,00
4	1	180	1	5	16230,78
5	0	150	0	3	2120,01
6	0	150	0	3	2140,62

A maior concentração de glicose para a menor granulometria da fibra de sisal estudada foi de 16.230,78 mg.L⁻¹ obtida para a maior temperatura 180 °C e maior concentração de ácido 5%. O valor da concentração de glicose foi maior do que o obtido para o de maior granulometria.

O estudo estatístico para o planejamento fatorial linear (com interação) mostrou que, para um nível de 95% de confiança, as variáveis estudadas não ofereceram efeito para a concentração da glicose, apresentando um coeficiente de determinação de 99,99%.

A Figura 23 apresenta o gráfico de Pareto para as variáveis estudadas e o mesmo indica que uma ampliação dos níveis estudados deve ser realizada, uma vez que a variável curvatura é significativa, bem como, concentração de ácido e temperatura a um nível de 95%, gerando uma qualidade coeficiente de determinação de 99,99%.

Figura 23 - Diagrama de Pareto da hidrólise ácida com menor granulometria (0,21mm) .



Para as hidrólises ácidas, obteve-s a maior concentração para glicose no experimento 4, ou seja, 180 °C e 5% de ácido sulfúrico, maior temperatura e maior concentração para ambas as granulometrias, porém, na menor granulometria se obteve a maior quantificação de glicose que é o interesse deste trabalho, visto que a glicose pode ser fermentada e convertida em etanol.

4.8.2. Hidrólise ácida da fibra pré-tratado ácido seguido de básico

Para a hidrólise ácida da fibra submetida ao pré-tratamento ácido seguido de básico foi utilizado um planejamento experimental 2^2 com 2 pontos centrais (Tabela 24).

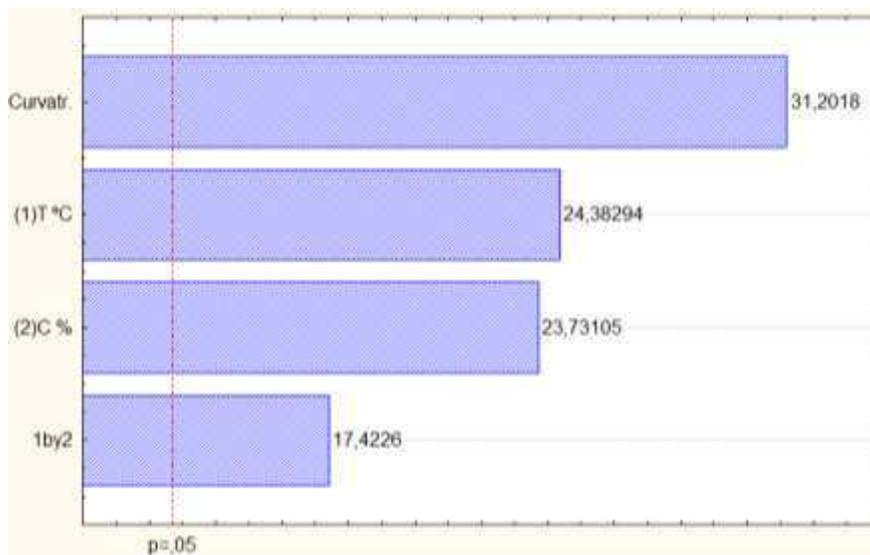
Tabela 24 - Matriz de planejamento para a hidrólise ácida da fibra pré-tratada com ácido seguida de básico

EX	T (° C)		C (%)		Glicose	HMF
1	-1	120	-1	1	67,46	2,15
2	1	180	-1	1	296,27	33,85
3	-1	120	1	5	274,84	23,94
4	1	180	1	5	1649,13	271,7
5	0	150	0	3	1483,46	99,2
6	0	150	0	3	1436,97	36,29

Na hidrólise ácida com a fibra de sisal, após tratamento ácido e alcalino, a quantidade de glicose obtida foi de $1.649,13 \text{ mg.L}^{-1}$ nas condições de maiores valores das variáveis temperatura $180 \text{ }^\circ\text{C}$ e C de 5% estudadas neste trabalho. A concentração de glicose obtida foi inferior aos demais valores obtidos para as hidrólises ácidas nas mesmas condições operacionais que as realizadas sem o pré-tratamento alcalino. Vale ressaltar que a granulometria da fibra de sisal para esse processo foi igual a $0,21\text{mm}$.

A análise estatística para o modelo fatorial aplicado para os experimentos mostrou em nível de 95% de confiança que o mesmo não foi significativo na faixa de valores das variáveis estudadas, inclusive tendo a falta de ajuste como um efeito significativo. A Figura 24 do diagrama de Pareto mostra que, quando verificada a curvatura como uma variável que pudesse ter efeito sobre a concentração glicose, a mesma passa a ser significativa, bem como, a temperatura, a concentração do ácido e a interação entre as mesmas. O coeficiente de determinação foi de $99,95\%$.

Figura 24 - Diagrama de Pareto para hidrólise ácida com pré-tratamento ácido seguido de básico variável glicose.



O pré-tratamento (ácido seguido de base), apesar de ter sido eficaz para a retirada de hemicelulose e lignina, como pode ser visto por meio dos dados de caracterização, em que ocorre uma maior concentração da celulose, passando do valor $58,40 \pm 0,94$ para $83,03 \pm 1,02$, teve como consequência a exposição ainda mais da estrutura cristalina da celulose, como já discutido por meio do DRX. Essa exposição na presença do ácido e da temperatura pode ter potencializado a decomposição da glicose ou desidratação formando HMF. Esses fatores associados podem ter contribuído para uma menor produção de glicose residual do que os demais processos de hidrólises ácidas realizados neste trabalho.

4.9. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi avaliada a partir da produção da glicose proveniente da celulose da fibra de sisal durante 84 h. O processo foi realizado para cargas enzimáticas de 10; 17,5 e 25 FPU/g e uma razão entre a massa de fibra e solução de extrato enzimático de 2; 3 e 4% (massa volume).

Estequiometricamente, para 1 g de celulose seca, pode-se obter teoricamente 1,1 g de glicose. A Tabela 25 apresenta a quantidade teórica máxima que se pode obter da fibra de sisal pré-tratada nas condições de razão massa de fibra de sisal/volume de extrato. Durante o processo de hidrólise enzimática, a obtenção máxima experimental desse valor dependerá da carga enzimática poder hidrolisar toda a massa contida no volume do extrato,

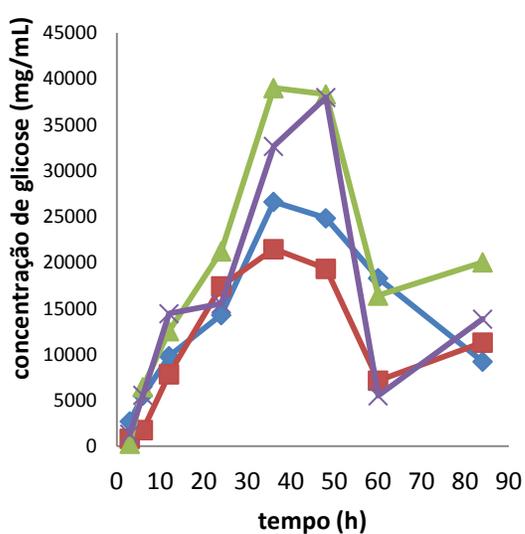
nas condições de temperatura e pH constantes 55 °C e 4,8 condições em que foi realizada a hidrólise.

Tabela 25 – Concentração teórica de glicose para cada condição trabalhada.

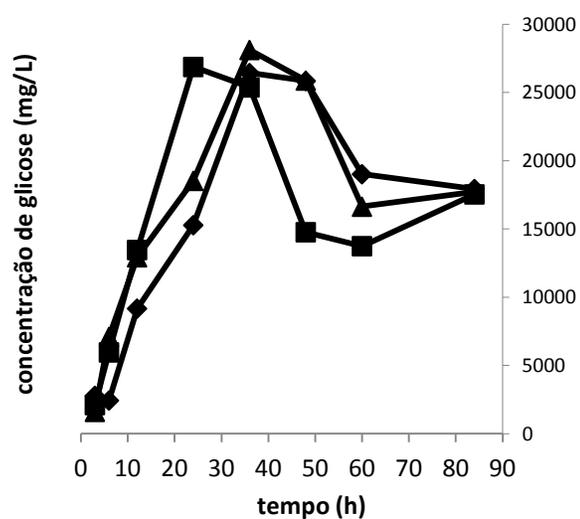
Experimento	Concentração de Glicose Teórica (mg/L)
1	18260
2	18260
3	36520
4	36520
5	27390
6	27390
7	27390

A Figura 25 (a) mostra o perfil cinético da hidrólise quando submetidos a condições experimentais nas condições das combinações do planejamento experimental fatorial. A Figura (b) apresenta os experimentos dos pontos centrais.

Figura 25. Perfil cinético da hidrólise enzimática: ◆ Carga = 10 FPU/g, Razão = 2% ■ Carga = 25 FPU/g, Razão = 2% ▲ Carga = 10 FPU/g, Razão = 4% ✕ Carga 25 FPU/g, Razão = 4%



(a)



(b)

Tabela 26 - Quantificação da glicose (mg.L^{-1}) da cinética da hidrólise enzimática

T(h)	Ex 1	Ex 2	Ex 3	Ex 4	PC	PC	PC
3	2709,59	823,95	287,55	1326,23	2787,42	2110,57	1608,29
6	5524,26	1772,89	6441,32	5558,11	2437,38	5967,13	7098,79
12	9815,13	7842,63	12539,9	14439,84	9175,74	13468,35	12937,85
24	14290,8	17411,21	21228,11	10520,66	15284,7	26875,39	8531,76
36	26610,07	21460,89	39000,00	32649,4	26431,73	25379,1	28122,05
48	24825,73	19321,57	38314,75	37970,92	25847,66	14771,42	25882,15
60	18303,88	7149,85	1641,28	5500,44	19019,61	3748,51	16639,76
84	9219,73	11294,33	20033,44	13843,74	11936,72	17542,22	17724,31

Observa-se, por meio da Figura 25 (a) e (b), que o comportamento cinético da hidrólise é similar e que os pontos máximos da produção de glicose ocorrem em aproximadamente 36 h. As velocidades iniciais até esse tempo são aproximadamente iguais, independente da carga e da razão, a queda das velocidades de hidrólise, após esse tempo, são mais acentuadas para as hidrólises realizadas com carga 10 FPU/g, Razão = 4%, Carga 25 FPU/g e Razão = 4% e Carga 17,5 FPU/g e Razão = 3%. Esse fato pode estar associado a uma inibição da enzima pelo produto mais rapidamente do que nas demais condições. Diante desse fato, pode-se afirmar que, nas condições das variáveis estudadas neste trabalho, o tempo para produção do licor hidrolisado não deve ultrapassar um tempo de 36 horas.

Na condição de carga 10 FPU/g e Razão = 4% e 36 h obteve-se a maior concentração de glicose $39000 \pm 2700 \text{ mg.L}^{-1}$, tendo uma pequena diferença para a mesma condição no tempo de 48 h com concentração de $38000 \pm 2700 \text{ mg.L}^{-1}$.

A Tabela 27 apresenta os resultados da matriz do planejamento da hidrólise da concentração da glicose quando são avaliados sobre a produção da mesma os efeitos da carga enzimática (FPU/g) e da relação massa seca fibra do sisal/extrato enzimático (g.mL^{-1}).

Tabela 27 - Matriz de planejamento da hidrólise enzimática na melhor condição

Ex	Carga enzimática (FPU/g)	Relação massa seca fibra do sisal/extrato enzimático (g/mL)	Glicose produzida(mg/L ⁻¹)
			36h
1	-1	-1	26610,07
2	1	-1	21460,89
3	-1	1	39000,00
4	1	1	32649,4
5	0	0	26431,73
6	0	0	25379,1
7	0	0	28122,05

O diagrama de Pareto é apresentado na Figura 26. Pode-se afirmar que, para a hidrólise enzimática, a carga enzimática (FPU/g), relação massa seca fibra do sisal/extrato enzimático (g/mL), influenciam o processo, aumentando a concentração de glicose. Os dados foram analisados em nível estatístico de 94% de confiança, apresentando um coeficiente de determinação de 88,33% (Tabela 28)

Figura 26. Diagrama de Pareto para a hidrólise enzimática em 36 h.

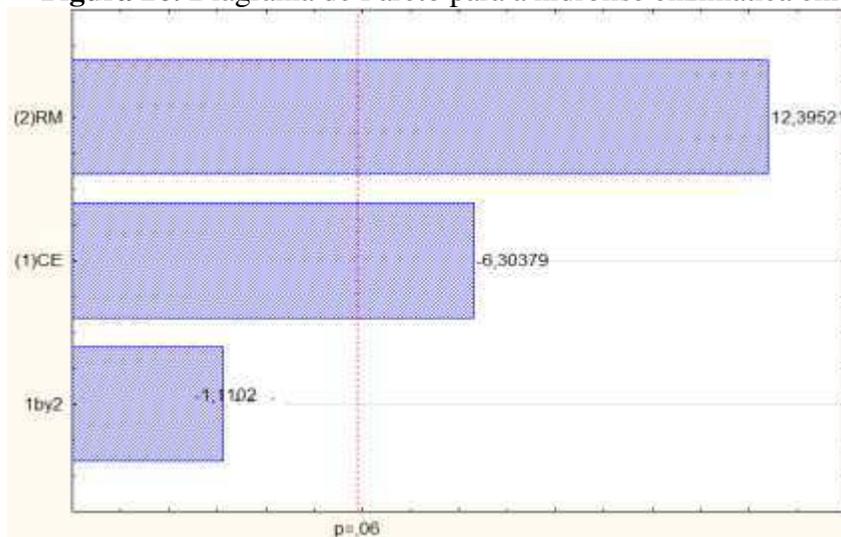


Tabela 28 - Análise de variância (ANOVA) para o licor hidrolisado com 36 horas.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	172046,946	2	86023471,1	2,23
Resíduo	26472981	4	5609469,75	
Total	194745675	6		
% R ²	88			

$$F_{\text{tabelado}} = 6,94$$

$$F_{\text{calculado}} = 15,33$$

GL – grau de liberdade; SQ - soma dos quadrados; MQ. – média quadrática dos desvios
Teste F - ($F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}}$)

Por meio do teste F de valor igual a 2,26 e, portanto, significativo, pode-se afirmar que a carga enzimática (FPU/g), relação massa seca fibra do sisal/extrato enzimático (g/mL) influenciaram a produção de glicose. Quando se aumenta a relação massa seca fibra do sisal/extrato enzimático (g/mL^{-1}) e diminui-se a carga enzimática (FPU/g), ocorre um aumento na concentração de glicose. Box et al., (1978) afirmam que, para valores de F maior que 1,00, o modelo estatístico é considerado significativo.

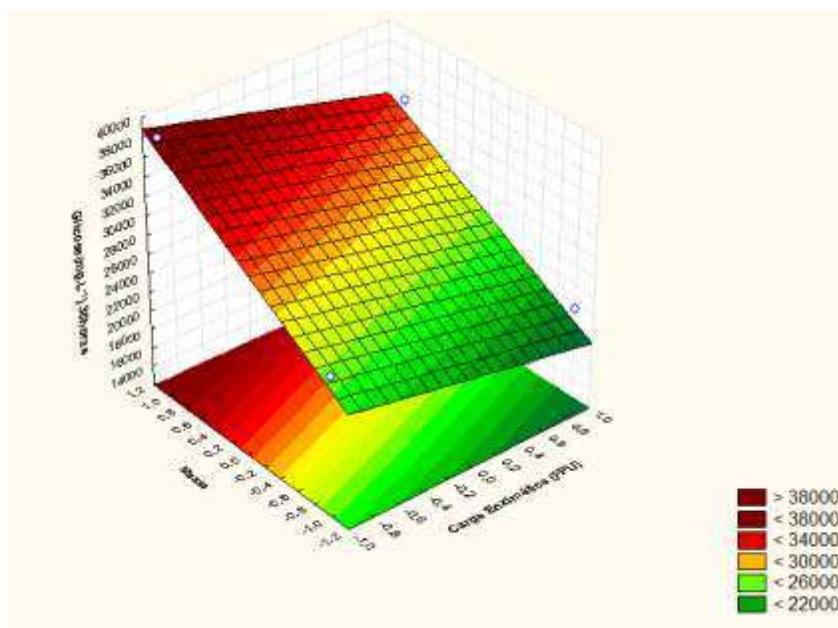
O modelo estatístico codificado com as variáveis significativas é apresentado na Equação: 11.

$$\text{Glicose (mg.L}^{-1}\text{)} = 28664,75 - 3124,945.T + 6144,61.C \quad (11)$$

A Figura 27 apresenta a superfície de resposta para a variável concentração de glicose do licor obtido da hidrólise enzimática da fibra do sisal. Observa-se que, nos intervalos estudados, a maior concentração de glicose da fibra de sisal ocorre para níveis mais altos da relação massa seca fibra do sisal/extrato enzimático e menores valores da carga enzimática. Sob o ponto de vista de processo, trabalhar com uma menor carga enzimática é interessante, visto que uma menor carga enzimática significa que o gasto em enzima será menor e que uma maior razão massa de substrato, ou seja, massa de sisal pressupõe que os sítios da enzima não foram todos complexados com o substrato e,

portanto, ainda não foram usados e a sua atividade máxima ainda não foi atingida, sendo um ponto positivo.

Figura 27 - Superfície de resposta para produção de glicose por hidrólise enzimática no tempo de 36 h.



4.10. Fermentação

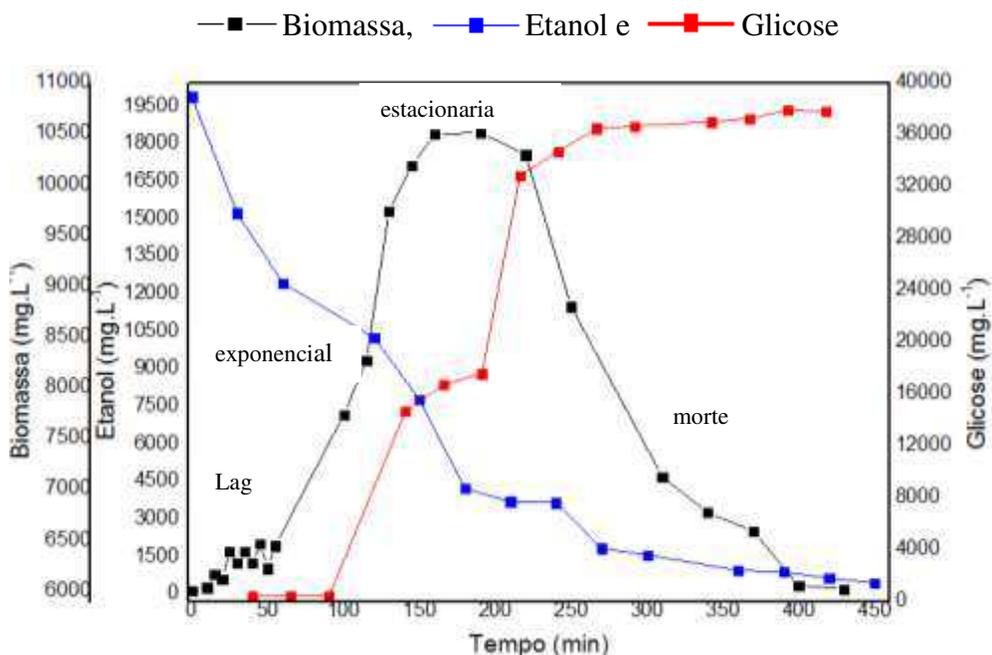
4.10.1. Avaliação da fermentabilidade do licor da hidrólise enzimática

A fim de avaliar a fermentabilidade do licor hidrolisado obtido nas melhores condições da hidrólise enzimática, foi realizada, a fermentação utilizando-se como agente fermentador a levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* Y904.

4.10.2. Cinética de fermentação para produção de etanol

Por meio da Figura 28 pode-se observar os perfis cinéticos da produção de etanol, consumo de glicose (substrato limitante) e crescimento microbiano referentes ao ensaio fermentativo, utilizando o licor hidrolisado enzimaticamente.

Figura 28 - Perfil cinético da produção de etanol e consumo de glicose e comportamento microbiano em função do tempo para fermentação do licor hidrolisado enzimaticamente.



Observando o gráfico, percebe-se que o início da produção de etanol se deu em duas horas de fermentação. No entanto, a estabilização da conversão de glicose em etanol foi alcançada em 7h e meia, porém, nem toda a glicose contida no licor foi consumida, havendo, ainda, uma concentração de glicose residual de $1.177,55 \text{ mg.L}^{-1}$, a levedura pode não ter consumido todo o açúcar devido à alta concentração do produto (etanol) que foi 19.687 mg.L^{-1} .

O tratamento hidrolítico com enzima não gerou inibidores do processo fermentativo como: HMF, ácido acético e furfural, considerados tóxicos ao microrganismo, bem como apresentou altas concentrações de glicose dissolvida no licor. Esse resultado no processo hidrolítico favorece a conversão em etanol, o que ocorreu neste trabalho, com uma eficiência fermentativa de 96%.

De acordo com Gibson et al., (2007) altas concentrações de sólidos dissolvidos no mosto acarretam fermentações incompletas, uma vez que as células tornam-se vulneráveis a vários mecanismos de estresse, dentre eles, o aumento da pressão osmótica externa e elevadas concentrações de etanol, os quais podem afetar o desempenho da levedura.

Segundo Ribeiro (2010), valores entre 350 a 500 g.L⁻¹ de açúcares redutores totais (ART) tornam o crescimento celular impossível devido à desidratação ocasionada pelo estresse osmótico.

Urbano (2012) avaliou a fermentabilidade de hidrolisados de diferentes materiais e em diferentes concentrações de glicose (180, 220 e 260 g.L⁻¹), em tratamentos com e sem aeração, utilizando duas linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Y904 e Y670). Para os ensaios fermentativos, em aerobiose e anaerobiose, com hidrolisados apresentando 180 e 220 g.L⁻¹ de glicose, as duas cepas, Y904 e Y670, foram capazes de metabolizar todo o conteúdo de substrato (glicose), no entanto, para os ensaios com os hidrolisados apresentando maior concentração de glicose (260 g.L⁻¹), foi percebido que o conteúdo de glicose não foi completamente consumido. Os ensaios conduzidos com a cepa Y904 apresentaram concentrações residuais de glicose de 28,40 e 48,60 g.L⁻¹, para os tratamentos em aerobiose e anaerobiose, respectivamente. De forma semelhante, os ensaios realizados com a cepa Y670 revelaram concentrações residuais de glicose de 31,50 e 24,60 g.L⁻¹, para os tratamentos em aerobiose e anaerobiose, respectivamente.

Steckelberg et al., (2006) isolaram e caracterizaram diferentes linhagens de levedura do gênero *Saccharomyces* oriundas de dornas de fermentação de 19 unidades produtoras brasileiras de etanol. Embora com variações previsíveis, todas as leveduras apresentaram características fermentativas adequadas ao processo industrial, tendo a linhagem Y904 revelado o maior valor encontrado para o nível de conversão de substrato (99,64%).

4.10.3. Determinação dos parâmetros fermentativos

A partir da concentração inicial de glicose (S_i), concentrações finais de glicose (S_f) e etanol (P_f) e do tempo final de fermentação (t_f), os parâmetros fermentativos foram calculados para o ensaio de fermentação do licor hidrolisados enzimaticamente por meio das equações exibidas no item 3.6.2, (pag 41 e 42) e os resultados encontram-se na Tabela 29.

Tabela 29 - Resultados obtidos para os parâmetros fermentativos referentes aos ensaios de fermentação conduzidos com o licor hidrolisado enzimaticamente.

Parâmetros	Licor da hidrólise enzimática
$Y_{P/S}$	0,49
Q_P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	2,07
η (%)	96
Y (%)	97
$\mu_{m\acute{a}x}$ h ⁻¹	0,3

O fator de conversão de glicose em etanol obtido ($Y_{P/S}$) para o ensaio fermentativo realizado foi de 0,49, que corresponde a 96% de eficiência de fermentação (η).

Como o fator de conversão $Y_{P/S}$ relaciona a quantidade de etanol produzido a partir da quantidade de glicose consumida, os resultados encontrados foram coerentes, uma vez que o licor hidrolisado enzimaticamente apresentou maior concentração de glicose (39.000 mg.L⁻¹ ± 2700) e a maior parte dessa glicose foi convertida em etanol ($Y_{\%}= 97$).

Tomando como referência os valores alcançados na indústria, os resultados obtidos nesta pesquisa para a eficiência de fermentação mostraram-se promissores. Segundo Ingledew (1999), na indústria, a faixa de eficiência de fermentação atinge de 90 a 93% do valor teórico de conversão de glicose a etanol. De acordo com Ribeiro (2010), o rendimento teórico de etanol por grama de glicose consumida ($Y_{P/S}$) é 0,511, sendo este valor considerado 100% quando o substrato for glicose. Como na condição de fermentação industrial brasileira, a eficiência alcançada é em média 91%, isto corresponde a 0,465 gramas de etanol por grama de glicose consumida.

Quanto à produtividade volumétrica em etanol (Q_p), parâmetro fermentativo que expressa a concentração de etanol produzido por tempo de fermentação, foi encontrado para o ensaio fermentativo com o licor hidrolisado por enzima ($2,70 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Melo et al., (2010) com vistas a produção de etanol, hidrolisaram o resíduo celulósico, oriundo da extração do óleo de sementes de mamona para a indústria de biodiesel, utilizando uma enzima hidrolítica. Após hidrólise, a fração solúvel foi usada como mosto, tendo como agente fermentador a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (10 g.L^{-1}). A análise cromatográfica do hidrolisado revelou a presença de 27 g.L^{-1} de açúcares redutores, tendo sido observada a completa conversão dos açúcares redutores após 8 h. Os parâmetros fermentativos determinados pelos autores revelaram-se inferiores aos encontrados neste estudo. A concentração de etanol atingida após 8 h de fermentação foi de 11 g.L^{-1} , o que equivale a uma produtividade volumétrica de $1,38 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e um rendimento em etanol por substrato consumido ($Y_{P/S}$) de 0,41, que corresponde a 80,2% de eficiência fermentativa.

O $\mu_{\text{máx}}$ mostra a velocidade específica de crescimento como função da concentração inicial de açúcar, é utilizado para calcular o crescimento celular em h^{-1} o que ocorre na fase exponencial à medida que o microrganismo consome o substrato (glicose).

Neste trabalho, obteve-se um $\mu_{\text{máx}} = 0,3 \text{ h}^{-1}$, resultado próximo ao encontrado por Govindaswamy e Vane (2007) que estudaram a cinética de crescimento e produção de etanol utilizando diferentes substratos (fontes de carbono) por *Sacaromeceae cerevisiae* e obtiveram $\mu_{\text{max}} = 0,29 \text{ h}^{-1}$ Andrietta et al., (2003) estudando a avaliação da influência da velocidade de alimentação sobre o rendimento e a produtividade dos processos de produção de etanol com a adição de 20% de cepa da levedura Y904, chegaram a um $\mu_{\text{máx}}$ de $0,45 \text{ h}^{-1}$ em meio de cultura otimizado. Analisando os valores encontrados na literatura, pode-se dizer que a velocidade de crescimento celular no licor da hidrólise enzimática da fibra do sisal pré-tratada teve um valor de $\mu_{\text{máx}}$ satisfatório no processo fermentativo e, conseqüentemente, na conversão de glicose em etanol.

Capítulo V

Conclusões

5. Conclusão

1 - Após a realização dos estudos observou-se que o pré-tratamento ácido seguido de básico mostrou-se bastante eficiente, ocorreu uma redução da lignina e hemicelulose e conseqüentemente um aumento na celulose o que favorece o processo de hidrólise por expor as regiões cristalinas da mesma facilitando a ação de ácidos e enzimas para conversão em glicose.

2- A análise de duas granulometrias para o pré-tratamento como para o processo hidrolítico mostrou-se eficiente, a fibra de sisal com menor granulometria apresentou maior quantidade de xilose no pré-tratamento e de glicose na hidrólise ácida, porém pra a menor granulometria os modelos estatísticos utilizados não foram significativos.

3 - Na hidrólise enzimática o resultado foi significativo para o tratamento ácido seguido de básico, obtendo-se valores de açúcares de 39000 mg.L¹ tendo uma quantificação maior do que a da hidrólise ácida.

4 -As maiores temperaturas e maiores concentrações de ácido obtiveram melhores respostas.

5 - Obteve-se um fator conversão de glicose em etanol de 0,49 que corresponde a eficiência de conversão de 96 %, produtividade volumétrica em etanol de 2,07g.L⁻¹.h⁻¹, velocidade de crescimento microbiano de 0,3 h⁻¹, indicando a eficiência do processo fermentativo.

6 - Conclui-se que a fibra do sisal apresenta elevado potencial para produção de etanol de segunda geração.

Capítulo VI

Referências

REFERÊNCIAS

ALAIN A.V. **Biomass to biofuels: Strategies for global industries.** Illinois, USA This edition first published Sloan Fellowship, 220 p, 2010.

ANDRIETTA, S. R.; FERREIRA, E.; ANDRIETTA, M. da G. S. **Avaliação da influência da velocidade de alimentação sobre o rendimento e produtividade dos processos de produção de etanol operando em batelada alimentada.** In: SINAFERM. Anais. 2003.

ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., AND NEGRO, M. J. **Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review.** Bioresource Technology, v.13, 851-861, 2010.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in energy and combustion Science**, v 34, p 551-573, 2008.

BARRETO, G. C. **Levantamento das tecnologias para produção de etanol de segunda geração: O Potencial do Brasil.** 71 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Salvador, Salvador, 2009.

BANERJEE, R.; PANDEY, A. **Bio-industrial applications of sugarcane bagasse: a technological perspective.** International Sugar Journal, Glamorgan, v.104, p.1238, 2012.

BASTOS, V. Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, mar. 2009.

BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M.; ZACCHI, G. Direct catalytic hydrogenation of bioethanol-from-sugarcane bagasse effluents over Ru/C catalyst: An eco-efficient environmentally-friendly approach. In: **XX Simpósio Ibero-Americano de Catálise, Gramado/ RS.** Anais XX SICAT, 2006.

BIODIESELBR **Álcool Etanol brasileiro.** Disponível em www.biodieselbr.com/energia/alcool/etanol.htm - acessado em 02 dez 2013.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters.** John Wiley e Sons, New York, p 653, 1978.

BRAGATTO, J. Produção de etanol a partir de casca de eucalipto, Tese de Doutorado, ESALQ/USP, Piracicaba, 150p. 2010.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Plano Nacional de Energia 2030/** Ministério de Minas e Energia; colaboração Empresa de Pesquisa Energética. Brasília: MME: EPE, 324 p 2007.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Matriz Energética Brasileira/** Ministério de Minas e Energia; colaboração Empresa de Pesquisa Energética. Brasília: MME: EPE, 55 p, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produção brasileira de cana-de-açúcar.** Brasília, 01/08/2010. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 03 março. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relatório das unidades produtoras cadastradas no departamento da cana-de-açúcar e agroenergia.** Brasília, 24/12/2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 03 de março. 2014.

CAMPBELL, C. Palestra sobre “**o mercado do sisal**”. In: Seminário da lavoura do sisal. 2004, Conceição do Coité. Anais ... Conceição do Coité, 2004.

CANILHA, L.; MILAGRES, A M. F.; SILVA, S. S.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: Uma estratégia de desconstrução da fibra vegetal. *Revista Analytica*, v. 44, p 123-128, 2010.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting A biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v 84, p 5-37, 2000.

CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. S. (Ed.). **Biomassa para energia**. Campinas: UNICAMP, v 1, 280 p, 2008.

CORREDOR, D. Y.; SUN, X. S.; SALAZAR, J. M.; HOHN, K. L.; WANG, D. Enzymatic hydrolysis of soybean hulls using dilute acid and modified steam-explosion pretreatments. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, v.2, p.1-8, 2008.

DENCE, C. W.; LIN, S. Y. *Methods in lignin chemistry*. New York: Springer Verlag, v 1, 220 p, 1999.

DE PAULA, M.P., LACERDA, T.M., FROLLINI, E., *Express Polymer Letters*, 2(6), 423-428, 2008.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, v.55, p.1–33, 2006.

EPE – O Rumor da energia no Brasil - Empresa de Pesquisa de Energética (2012) Disponível em: <<https://ben.epe.gov.br>>. Acessado em: 09/2013.

FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – Artigo . **Fibra de futuro**. 2009. Disponível em: <<http://www.revistapesquisa.fapesp.br>>. Acesso em 03 dez. 2013.

FENGEL, D. e WEGENER, G. Wood and cellulosic chemistry. New York, Bioresource Technology, v.32, p.189-200, 2009.

FOUAD, B.; JOVER, J.; GONZALEZ, E. Hydrolysis of bagasse with sulfuric acid in obtaining bioethanol. Ingenieria Quimica, v 37, p 240-248. 2009.

FREITAS, S. S. Avaliação de pré-tratamentos em resíduo oriundo do cultivo do milho Dissertação, Universidade Tiradentes – UNIT, Aracaju –SE, 59 Pg., 2011.

FUKUDA, H.; KONDOB, A.; TAMALAMPUDIA, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal wholecell biocatalysts. Biochemical Engineering Journal, v.44, n. 1, p.2-12, Apr. 2009.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos – Bietanol de cana-de-açúcar: PeD para produtividade e sustentabilidade, Luis Augusto Barbosa Cortez, coordenador. – São Paulo: Parte 4 – Cap.12, p.697-716 Blucher, 2010.

GIBSON, B. R.; LAWRENCE, S. J.; LECLAIRE, J. P. R.; POWELL, C. D.; SMART, K. A. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **Microbiology Reviews**, v.31, p.535-69, 2007.

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

GOMEZ, E. O.; SOUZA, R. T. G.; ROCHA, G. J. M.; ALMEIDA, E.; CORTEZ, L. A. B. Avaliação de resíduos lignocelulósicos para a produção de etanol 2G. **Revista Analytica**, v.45, p.180, 2010.

GOVINDASWAMY, S.; VANE, L. M. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose - fermenting yeast. Bioresource Technology, v.98, p.677–685, 2007

GRAF A.; KOEHLER, T. **Cellulose-ethanol Study**. Oregon Office of Energy. Salem OR USA, 30 p, 2000.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – The fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, v.24, 2010.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. **Microbiologia ilustrada**. 2. ed. Porto, 2008.

HENDRIKS, A.T.W.M., ZEEMAN, G. **Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass**. *Bioresource Technology*, Ev Wageningen, p.10-18, 2009.

HIMMEL, M.E.; DING, S.Y.; JOHNSON, D.K.; ADNEY, W.S.; NIMLOS, M.R.; BRADY, J.W. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*. 315,804–807, 2007.

IDEA - Instituto de Desenvolvimento Agroindustrial LTDA. **Indicadores agrícolas do setor sucroalcooleiro**. Safra 2005/2006. Ribeirão Preto: IDEA, 2007.

INGLEDEW, W. M. **Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer, in the alcohol textbook**. UK: Nottingham University Press, 3 ed., 386 p., 1999.

JA'AFARU, M. I.; FAGADE, O. E. **Cellulase production and enzymatic hydrolysis of some selected local lignocellulosic substrates by a strain of *Aspergillus niger***. *Research Journal of Biological Sciences*, v.2, p.131, 2007.

JARDINE, J. G.; DISPATO, I.; PERES, M. R. **Considerações sobre o bioetanol lignocelulósico para subsidiar a elaboração de conteúdo da árvore de conhecimento a agroenergia**. 2009. 28 p. Embrapa Informática Agropecuária. Campinas, SP, 2009.

KOHLHEPP, G. **Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil.** Estudos avançados. [online]., v.24, n.68, p 223-253, 2010.

KRISHNA, S. H.; REDDY, T. J.; CHOWDARY, G. V. Simultaneous saccharification and ferment Ind. Engineering Chemical Research., v 48, p 3713-3729, 2009.

KUMAR, P; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. L. J. E.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. Ind. Engineering Chemical Research., v. 48, p. 3713-3729, 2009.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. Biomass and Bioenergy, v.23, n.5, p.367-380. 2011.

LEÃO, D. A. S. ; CONCEICAO, M. M. da; CONRADO, L. S; LIMA, C. S. S. SILVA, F. L. H; SILVA, A. S. . **Optimization of prehydrolysis and hydrolysis of bagasse sisal.** In: ISAF: International Symposium on Alcohol Fuels. Cidade do Cabo. biotechnology for bio fuels. Cidade do Cabo, 2013. v. 06. p. 109. 2013

LIMA, A. O. S. e RODRIGUES, A. L. Sacarificação de resíduos celulósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa, Revista de Ciências Ambientais, v.1, p.5-18, 2007.

LIMA, A. C; GARCÍAN, N. H. P.; LIMA, J. R. Obtenção e caracterização dos principais produtos do caju. B. CEPPA, v 22, p 133-144, 2004.

LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A. Álcool carburante: Uma estratégia brasileira. Curitiba: Editora UFPR, 248 p, 2005.

MACEDO, I.; NOGUEIRA, L. **Biocombustíveis**. Cadernos NAE, 02/2004. Núcleo de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, Brasília, 2010.

MARIANO NETO, J. M. CONRADO. L, S; BRANDÃO. A, S. **Estudo da fermentação do hidrolisado da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) para produção de álcool etílico**, Anais: XIX Congresso brasileiro de engenharia química – Búzios-RJ, COBEQ, 2013

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

MARTINS D. B.; SOUZA C. G. JUNIOR.; SIMÕES D. A.; MORAIS, M. A. JUNIOR. The - galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentrations of galactose. *Microbiology Reviews* v 44, p 379–382, 2009.

MEDINA, J. C. **O sisal**. São Paulo: Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. Diretoria de Publicidade Agrícola, p.217-221, 1959.

MELO, G. R. **Produção de celulasas e xilanases pelo fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes substratos lignocelulósicos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, p. 67. 2010.

MENDES, T. D. T. F. PACHECO, CARVALHO, F. B. P. D. K. NAKAI, D. S. RODRIGUES, C. M. M. MACHADO, AYRES, M.; **Avaliação de diferentes pré-tratamentos para desconstrução da biomassa lignocelulósica**, COBEQ –XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Búzios –RJ, 2012.

MEGIATTO, J. J. D. Fibras de sisal: Estudo de propriedades e modificações químicas visando aplicação em compósitos de matriz fenólica. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, 267 pg, 2007.

MORAIS, J. P. S; ROSA, J. M; MARCONCINI, M. F. **Procedimentos para análise lignocelulósica**. - Campina Grande: Embrapa Algodão, Documentos, 236, 54 p, 2010.

MOSIER, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass”, *Bioresource Technology*, v 96, p 673-686, 2005.

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, p.673-686, 2009.

NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Químicos) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, 126p, 2011.

NEUMANN, M.; RESTLE, J.; NÖRNBERG, J. L.; ALVES, D. C.; MELLO, R. O.; , SOUZA, A. N. M.; PELLEGRINI, L. G.; . **Avaliação da qualidade e do valor nutritivo da silagem de híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor*, L. MOENCH)**. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.3, n.1, p.120-133,2004.

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

OLIVEIRA, F. M. V. Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 98 p, 2011.

OLIVEIRA, S. F; JUNQUEIRA R. J. MASCARENHAS, E. A. Caracterização físico-química e nutricional do fruto da palma (*Opuntia ficus indica* L. Mill) cultivada no sertão do submédio São Francisco. *HOLOS*, Ano 27, v.3, p. 25-30, 2011.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B.; ZACCHI, G. Kinetics of ethanol production by recombinant *Escherichia coli* KO11. *Biotechnology and Bioengineering*, v.45, p.356–365, 1996.

PAIVA, J. M. F.; FROLLINI E. Sugarcane bagasse reinforced phenolic and lignophenolic composites. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 83, p. 880-888, 2002.

PAIXÃO, M; C; S. **Etanol na Paraíba**: aumento das exportações e aspectos ambientais da produção - Dissertação.- João Pessoa, 108p, 2009.

PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.107, p.65-72, 2004.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 17-24, 2000.

PRADO, A. G.; R, S. C.; ABREU, C.A.M. Quantificação dos extrativos, celulose e lignina da palma miúda (*Napalea cochenillifera*). In: Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão- UFRPE, 10 Anais... Recife – PE, 2010.

PRADO, J. L. **Fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast**. *Bioresource Technology*, New York, v 2, 2010.

PEREIRA JR, N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. (2008b). Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**. Biblioteca Nacional: Rio de Janeiro, v. 2, 2009 a.

PEREIRA, V. R.; COSTA, S. S.; ROCHA, S. C. S. Análise do crescimento da celulose microcristalina granulada em leite vibrofluidizado. In Congresso brasileiro de engenharia

química em iniciação científica, 8., 2009, Uberlândia/MG, Anais... Campus de Santa Mônica: UFU, 2009 b.

PHILIPPINI, R. R. Variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar: caracterização química e hidrólise enzimática em condições de pré-tratamento diferenciadas. 2012. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

PROSSIGA. **Panorama do setor de sisal no Estado da Bahia**. Disponível em: <http://www5.prossiga.br/arranjos/vortais/sisal_ba_panorama1>. acesso em 20 de maio 2014.

RABELO, S. C., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. Avaliação de pré-tratamentos e modelagem da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol. In: V Encontro de Pesquisa da Faculdade de engenharia Química. UNICAMP, Campinas 2007.

RIBEIRO FILHO, N. M.; FLORÊNCIO, I. M.; ROCHA, A. S.; DANTAS, J. P.; FLORENTINO, E. R.; SILVA, F. L. H. Aproveitamento do caldo do sorgo sacarino para produção de aguardente. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.14, n.1, p.9-16, 2010.

RIVERES, G. P. V; Synthesis and characterization of methyl cellulose from sugar cane bagasse cellulose. Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia. *Carbohydrate Polymers*, v. 67, p. 182-189. 2007.

ROCHA, G. J. M.; SILVA, J. S. Estudo comparativo de polpas celulósicas obtidas a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por solução ácida e explosão a vapor. **XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2006

ROCHA, M. V. P. Produção de bioetanol a partir de pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) por fermentação submersa. Tese de Doutorado em Engenharia Química. UFRN, 121p. Natal, RN, 2010.

RODRIGUES, R. S. Produção de enzimas e avaliação do pré-tratamento ácido de biomassas para produção de bioetanol. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa, 81 pg, 2011.

ROSILLO-CALLE, F.; CORTEZ, L. A. B. **A review of the brazilian ethanol programme**, Biomass and Bioenergy, v 14, p 115-124, 2005.

ROSSELL, C.E.V **Conversion of lignocellulose biomass (bagasse and straw) from the sugar-alcohol industry into bioethanol**. Industrial perspectives for bioethanol. Ed. Telma Franco. Cap. 8, p.123-142, 2006.

SANTOS, A. L. F., GOUVEIA, A, F. Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide. The Journal of Supercritical Fluids, Rio de Janeiro, p.277-282, 2011.

SANTOS. F, A,. **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol**. Química Nova, vol.35, n.5, pp. 1004-1010. 2012.

SARKAR, N; **Bioethanol production from agricultural wastes: An overview**. Renewable Energy, p.19-27, 2012.

SEABRA, J. E. A. **Avaliação técnico-econômica de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil**. 2008. 288 p. Tese (Doutorado) -Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

SILVA, R. R. O. **Desenvolvimento da cultura do sisal nas regiões semi-áridas do nordeste brasileiro**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, Manual, 100 p, 1994.

SILVA, V. F. N. **Estudo de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapa no processo de obtenção de etanol celulósico.** 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2011.

SILVA, G. A. F. **Produção e caracterização de compostos fenólicos com fibras de sisal modificadas...**Dissertação (mestrado em Engenharia de Materiais) –REDEMAT, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto,92 p, 2009.

SILVERSTEIN, R.; CHEN, Y. E; SHARMA-SHIVAPPA, R.; BOYETTE, M.; OSBORNE, J. Comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology*, v.98, p.3000 - 3011, 2009.

SIQUEIRA, G. A. F. Preparation of ethylenediamine-anchored cellulose and determination of thermochemical data for the interaction between cations and basic centers at the solid/liquid interface. *Carbohydrate Research*, v.341, n.17, p.2842-2850, 2006.

SOUSA, M. L. A produção do sisal na Paraíba: O município de Cuité, um estudo de caso. Campina Grande, UFPB, 1987. Dissertação (Mestrado em Economia Rural) Universidade Federal da Paraíba, 1987.

STRYER, L. *Bioquímica*, 8ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1000, 2009.

STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R. Caracterização da biomassa isolada de processos fermentativos de produção de etanol para uso como biocombustíveis. **Encontro de Energia no Meio Rural**, An. 6, Campinas, 2006.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, v.34, p. 421–424, 2009.

SUN, Y., J. CHENG, Hydrolysis of linocelulosic materials for ethanol production: A Review, *Bioresource Technology*, v.83 p.1-11 2005.

TRINDADE. W, G.; MEGIATTO. W; RAZERA J. CASTELLAN D.; FROLLIN. A, T.; Polpação do curauá visando posterior sacarificação. *Biomacromolecules*, v.6, p.2485 – 2496, 2005.

UMIKALSON, M. S; ARIFF, A. B; SHAMSUDDIN, Z. H; TONG, C. C; HASSAN, M. A; KARIN, M. I. A. Production of cellulase by a wild strain of *Chaetomium globosum* using delignified oil palm empty-fruit-bunch fibre as substrate. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, v.47, n.5, p.590-595, 2007.

URBANO, L. H. **Fermentação etanólica em mostos de hidrolisados de sorgo. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais***, v.3, n.8, p.122-128, 2012

VANCOV, T; MCINTOSH, S. Mild acid pretreatment and enzyme saccharification of sorghum bicolor straw. *Appl Energy*; v.92, p.421-8, 2012.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA JR., M. B.; PEREIRA JR., N. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.136-140, p.141-154, 2007.

VILLAR, J. Effect of an acid catalyst on prehydrolysis of sugarcane bagasse, leaf trash and pith at low liquid/solid ratios. Cuba. *Revista sobre los derivados de la cana de azúcar*. v.18, n.1, p.61-65. 2010.

WANDERLEY, M. C. DE A. **Hidrólise enzimática de bagaço de cana de açúcar em batelada alimentada para produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 em processo SHF/ Dissertação de Mestrado, 80 p, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.**

WYMAN, C. E; DECKER, S. R; HIMMEL, M. E; BRADY, J. W; SKOPEC, C. E; VIKARI, L., **Hidrolisis of cellulose and hemicellulose. Em Polysaccharides: Strutural: Diversity and functional versatility**, Dumitrius, S. Ed 2^a, p.995-1034, 2005.

YANG, S. H.; LAND, M. L.; KLINGEMAN, M.; PELLETIER, D. A.; LU, T. Y. S.; MARTIN, S. L.; GUO, H. B.; SMITH, J. C.; BROWN, S. D. Paradigm for industrial strain improvement identifies sodium acetate tolerance loci in *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, v.107, n.23, p.10395-103400, 2010.

YU, Z.; ZHANG, H. Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, v.93, p.199-204, 2004.

ZHAO, Y.; LU, W. J.; WANG, H. T. Supercritical hydrolysis of cellulose for oligosaccharide production in combined technology. **Chemical Engineering Journal**, v. 150, p.411-417, 2009.

ZHANG, Y.H.P.; LYND L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.88 p.797–824, 2004.