

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE ENGENHARIAS
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA



Trabalho de Conclusão de Curso

**Caracterização e rendimento de hidrólise e fermentação de
biomassa de arundo, palha e casca de arroz**

Vitória Quincoses Azevedo

Pelotas, 2015

VITÓRIA QUINCOSES AZEVEDO

**Caracterização e rendimento de hidrólise e fermentação de
biomassa de arundo, palha e casca de arroz**

Trabalho acadêmico apresentado ao
Curso de Engenharia Ambiental e
Sanitária, da Universidade Federal de
Pelotas, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Ambiental e Sanitarista.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Fernanda Lemons e
Silva

Pelotas, 2014

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a Cláudia Fernanda Lemons e Silva – Centro de Engenharias/UFPeI -
Orientadora

Prof.. Dr^a Vanessa Sacramento Cerqueira – Centro de Engenharias/UFPeI

M.Sc. Juliana Silva Lemões – Instituto de Química/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela graça dada a mim, em ter permitido chegar até esta etapa..

Aos meus pais e familiares, pelo amor, apoio e conselhos, os quais foram de vital importância para enfrentar as etapas e os momentos mais difíceis sempre me ajudaram a levantar e seguir em frente. Sem vocês não seria essa pessoa que sou hoje. Muito obrigada!

Aos meus amigos que sempre estiveram do meu lado, me ajudando e torcendo por mim. São amizades que conquistei e que vou levar para o resto da vida.

À professora Cláudia e ao pesquisador Sérgio, pela oportunidade e confiança deposita em mim.

Sem palavras para agradecer a Sabrina e Juliana por toda a força que me deram no laboratório durante esse período, por me aguentarem reclamando e choramingando quando os resultados não saiam como o esperado, pelos conselhos, ideias e pela motivação para realização deste trabalho.

À professora Maria do Carmo Puaró Peralba, por ter permitido a realização das análises de cromatografia na UFRGS.

À todos os professores que contribuíram para minha formação, pelos ensinamentos e pelas oportunidades.

MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

AZEVEDO, Vitória Quincoses. **Caracterização e rendimento de hidrólise e fermentação de biomassa de arundo, palha e casca de arroz.** 2015. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Novas alternativas para geração de energia que sejam renováveis e que não prejudiquem o meio ambiente têm sido buscadas. Uma alternativa são os biocombustíveis, como o etanol de segunda geração, que tem um potencial promissor devido ao fato de que a matéria-prima utilizada para sua produção é um subproduto das atividades agrícolas, e com isso uma forma extremamente vantajosa para a destinação final da biomassa. Nesse contexto, o presente estudo objetivou a caracterização das biomassas de arundo, palha e casca de arroz quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina antes e após o pré-tratamento, o comportamento dos açúcares nas etapas de hidrólise enzimática e fermentação por SHF (hidrólise separada da fermentação) e o rendimento de etanol por massa e área cultivada das três biomassas. A biomassa que apresentou maior concentração de açúcares fermentáveis foi a palha de arroz, chegando ser o dobro das concentrações encontradas no arundo e casca de arroz. Por esse motivo a palha apresentou um rendimento de etanol de 134,13 L/t, já o arundo apresentou 51,20 L/t e a casca 24,72 L/t. Porém, considerando a estimativa de rendimento de biomassa por área, verifica-se que o rendimento de etanol por hectare de arundo é bem superior ao de arroz, sendo 2560 L/ha para esta biomassa, 536,52 L/ha para palha e 49,44 L/ha para casca de arroz. O potencial do uso de biomassa para produção de etanol foi demonstrado e pode ser otimizado empregando outras condições de pré-tratamento, hidrólise e fermentação, para que assim sejam atingidos rendimentos ainda mais elevados.

Palavras-Chave: Etanol de segunda geração. Biomassa. Pré-tratamento. Hidrólise enzimática

ABSTRACT

AZEVEDO, Vitória Quincoses. **Characterization and yield of hydrolysis fermentation of biomass arundo, straw and rice husks.** 2015. 49 f. Final Project. BSc in Environmental and Sanitary Engineering. Federal University of Pelotas.

New renewable and environmental friendly alternatives for energy generation have been searched. An alternative is biofuels, such as second generation ethanol, which has a promising potential due to the fact that the raw material used for its production is a by-product of agricultural activities, and thus an extremely beneficial way for the biomass disposal. In this context, the present study aimed to characterize the biomass of arundo, straw and rice husks as the cellulose content, hemicellulose and lignin before and after pretreatment,, the behavior of sugars in steps of enzymatic hydrolysis and fermentation by SHF (Separate hydrolysis of the fermentation), and ethanol yield by mass and acreage of the three biomasses. The biomass with the highest concentration of fermentable sugars was rice straw, reaching be double the concentrations found in arundo and rice husk. For this reason the straw showed an ethanol yield of 134.13 L / t, already presented arundo 51.20 L / tea bark 24.72 L / t. However, considering the estimated yield of biomass per area, it turns out that the ethanol yield per hectare of Arundo is much higher than rice, with 2560 L / ha for this biomass 536.52 L / h for straw and 49 , 44 U / ha for rice hulls. The potential use of biomass for ethanol production was demonstrated and can be optimized using other conditions of pretreatment, hydrolysis and fermentation, so that even higher yields are achieved.

Keywords: Second Generation Ethanol. Biomass. Pretreatment. Enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Rotas tecnológicas para produção de etanol | 16 |
| Figura 2: Polímeros constituintes dos materiais lignocelulósicos | 19 |
| Figura 3: Estrutura da parede celular de vegetais..... | 20 |
| Figura 4: Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular | 20 |
| Figura 5: Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila. A: celulose cristalina está no centro da microfibrila e é envolta pelo substrato amorfo. B: As regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal | 21 |
| Figura 6: Alcoóis formadores da molécula de lignina | 22 |
| Figura 7: Representação esquemática da produção de etanol de biomassa lignocelulósica | 23 |
| Figura 8: Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica | 24 |
| Figura 9: Reação global da fermentação alcoólica..... | 26 |
| Figura 10: Concentrações de glicose para as diferentes biomassas analisadas em relação ao tempo de hidrólise enzimática. | 35 |
| Figura 11: Concentrações de açúcares redutores das diferentes biomassas analisadas em relação ao tempo de hidrólise enzimática. | 36 |
| Figura 12: Concentração de glicose, xilose e etanol para biomassa de arundo durante o processo fermentativo. | 37 |
| Figura 13: Concentração de glicose, xilose e etanol para biomassa de palha de arroz durante o processo fermentativo. | 39 |
| Figura 14: Concentração de glicose, xilose e etanol para biomassa de casca de arroz durante o processo fermentativo. | 39 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Diferenças entre celulose e hemicelulose | 22 |
| Tabela 2: Comparação das condições e desempenho dos três processos de hidrólise..... | 25 |
| Tabela 3: Comparação entre hidrólise ácida e enzimática de biomassa lignocelulósica para produção de etanol | 26 |
| Tabela 4: Composição química das biomassas in natura de arundo, palha e casca de arroz. | 33 |
| Tabela 5: Composição química das biomassas pré-tratadas de arundo, palha e casca de arroz..... | 34 |
| Tabela 6: Estimativa e rendimento teórico de etanol..... | 40 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 Objetivos | 13 |
| 1.1.1 Objetivos gerais | 13 |
| 1.1.2 Objeitos específicos..... | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 15 |
| 2.1 Biocombustíveis | 15 |
| 2.2 Matérias-primas para produção de etanol..... | 15 |
| 2.2.1 Arroz | 16 |
| 2.2.2 Arundo | 17 |
| 2.3 Características estruturais dos materiais lignocelulósicos | 18 |
| 2.3.1 Celulose..... | 20 |
| 2.3.2 Hemicelulose | 21 |
| 2.3.3 Lignina | 22 |
| 2.4 Etapas de produção do etanol de segunda geração..... | 23 |
| 2.4.1 Pré-tratamento..... | 24 |
| 2.4.2 Hidrólise..... | 24 |
| 2.4.3 Fermentação..... | 26 |
| 3. METODOLOGIA | 28 |
| 3.1 Preparo da amostra | 28 |
| 3.2 Caracterização da biomassa..... | 28 |
| 3.3 Hidrólise Enzimática..... | 29 |
| 3.4 Fermentação | 29 |
| 3.5 Análises | 30 |
| 3.5.1 Caracterização das biomassas..... | 30 |
| 3.5.1.1 Celulose | 30 |
| 3.5.1.2 Hemicelulose | 30 |
| 3.5.1.3 Lignina | 30 |
| 3.5.2 Hidrólise..... | 31 |
| 3.5.2.1 Método enzimático de glicose oxidase (C1)..... | 31 |
| 3.5.2.2 Método para determinar a concentração de açúcares redutores totais (C2) | 31 |
| 3.5.3 Fermentação..... | 32 |

| | |
|--|----|
| 3.5.3.1 Cromatografia Liquida..... | 32 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 33 |
| 4.1 Caracterização das biomassas | 33 |
| 4.2 Hidrólise enzimática | 35 |
| 4.3 Fermentação..... | 37 |
| 4.4 Rendimento teórico..... | 40 |
| 5. CONCLUSÃO | 42 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 43 |

1. INTRODUÇÃO

Um marco representativo para a história mundial são os processos de geração de energia. De maneira geral podemos dizer que existe dois tipos de energia, as geradas a partir de recursos renováveis e as geradas a partir de recursos não renováveis (FURTADO, 2010). Os combustíveis fósseis são um exemplo de recursos não renováveis, e são representados por petróleo, gás natural e carvão mineral (GOLDEMBERG, 2009). A principal fonte de energia utilizada pelo homem até hoje são os combustíveis fósseis, que são originados pela decomposição de resíduos orgânicos e encontrados em áreas profundas do solo ou no fundo do mar. A queima destes combustíveis é usada para gerar energia e movimentar motores de máquinas, veículos e até mesmo gerar energia elétrica.

Conforme dados da Agência Internacional de Energia (AIE), aproximadamente 87% de todo o combustível consumido no mundo é de origem fóssil. No Brasil, 59% da energia gerada é proveniente de recursos não renováveis, sendo que 39,3% de petróleo e seus derivados, 12,8% gás natural, 5,6% carvão mineral e 1,3% urânio (BRASIL, 2013). Só no ano de 2013 foram lançados na atmosfera mais de 450 milhões de toneladas de dióxido de carbono, principal responsável pelo aquecimento global segundo o Painel Intergovernamental de Mudanças do Clima.

Uma forte linha de pesquisa são os biocombustíveis, que são considerados uma fonte de energia limpa e renovável. Segundo o Ministério do Meio Ambiente – MMA (BRASIL, 2012)

Biocombustível é qualquer combustível originado de espécies vegetais - isto é, que tem origem biológica, desde que não tenha passado por processo de fossilização. De acordo com a definição técnica da Lei nº 9.478, de 6 de agosto de 1997, biocombustível é todo combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna; ou, conforme regulamento, para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil.

Os biocombustíveis podem ser gerados a partir de diversos materiais como cana-de-açúcar, carvão vegetal e plantas oleaginosas (girassol, dendê, soja, amendoim, mamona), entre outros. Os principais biocombustíveis utilizados são o bioetanol e o biodiesel (o primeiro é produzido a partir da fermentação de hidratos de

carbono (açúcar, amido, celulose), e o segundo é obtido a partir de óleos orgânicos (PAULA, 2013).

O etanol de primeira geração, que é gerado a partir da sacarose da cana, vem sendo cada vez mais produzido porque é, até o momento, o único combustível com capacidade de atender à crescente demanda mundial por energia renovável de baixo custo e de baixo poder poluente (SANTOS *et al.*, 2012). Porém hoje, encontramos grandes estudos para desenvolver processos cada vez mais econômicos utilizando materiais lignocelulósicos, também conhecido como etanol de segunda geração, produzido a partir da celulose e hemicelulose, presente em resíduos agrícolas (RABELO, 2010).

A importância de se utilizar resíduos para produção do etanol celulósico é que a sua matéria-prima é um subproduto das atividades agrícolas, e por apresentar poucos nutrientes não serve para alimentação humana e animal. Por este motivo, o aproveitamento desses resíduos para a produção de combustível é uma forma extremamente vantajosa para a destinação final da biomassa (HICKERT, 2010). Além disso, diminui consideravelmente a competição pelo uso da terra para produção de alimentos. Sem precisar ampliar os canaviais, usando apenas a palha e o bagaço, o Brasil tem potencial de aumentar em 50% a produção de etanol (STAVELA, ARAÚJO, PORTO, 2014). Apesar das grandes vantagens, ainda encontramos algumas dificuldades, como por exemplo, tecnologias ainda não completamente desenvolvidas, com baixo rendimento na conversão da matéria-prima em bioetanol e com custo de produção elevada.

O *Arundo donax* L. é uma planta que apresenta um grande potencial para produção de etanol de segunda geração, por se adaptar facilmente em qualquer condição ambiental, apesar de exigir grandes quantidades de água para seu crescimento apresenta pouca exigência acerca da fertilidade do solo, tem um crescimento rápido e uma produtividade elevada (SOUZA, 2014).

. Outra cultura que apresenta grande potencial para aproveitamento de biomassa é a cultura do arroz irrigado. Com cerca de 11 milhões de toneladas de arroz o Brasil, está entre os dez principais produtores mundiais deste grão. A região

sul contribui com cerca de 77% da produção nacional, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor brasileiro, com 65% desta produção (BRASIL, 2014).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2014), o Brasil irá colher 14 milhões de toneladas de arroz na safra de 2023/2024, sendo essas projeções avaliadas pela Assessoria de Gestão Estratégica do MAPA. Com esse aumento da produção, aumenta também a quantidade de resíduos gerados, na qual se destacam a palha e a casca de arroz.

Esses resíduos resultam do processo de beneficiamento do arroz como um subproduto, a casca corresponde cerca de 20% da produção de arroz (SCHWAB *et al.*, 2010) e a palha cerca de 23% (NUNES *et al.*, 2013). Por esse motivo o Rio Grande do Sul tem um grande potencial para produção de etanol de segunda geração.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

O trabalho tem por objetivo geral avaliar o potencial das biomassas palha e casca de arroz e planta inteira de arundo e os produtos da hidrólise e fermentação das biomassas visando à produção de etanol de segunda geração.

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina as biomassas antes e após o pré-tratamento químico;
- Avaliar o rendimento de açúcares liberados na etapa de hidrólise enzimática das biomassas pré-tratadas;
- Determinar o rendimento de etanol produzido a partir da fermentação dos hidrolisados das três biomassas;

- Calcular o rendimento de etanol por massa e área cultivada das três biomassas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biocombustíveis

Os biocombustíveis podem ser divididos em dois grupos, os de primeira e os de segunda geração. Hoje em dia, devido aos avançados tecnológicos e caminhos de produção, podemos classificar ainda em de terceira geração e quarta geração (ALMEIDA, 2009; BRANDÃO, 2011). Os de primeira geração são aqueles produzidos a partir dos açúcares ou amidos (cana, beterraba, milho, trigo, mandioca, arroz), no caso do etanol, e a partir da transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal (soja, mamona, dendê, sebo, óleo de fritura) no caso do biodiesel (FILHO, 2010). O grande problema enfrentado pelos biocombustíveis de primeira geração é a disponibilidade de matérias-primas e a possibilidade de competição com a produção de alimentos (HICKERT, 2010).

Para obtenção dos biocombustíveis de segunda geração são utilizados materiais lignocelulósicos não comestíveis, como resíduos agrícolas, florestais e urbanos e com isso, elimina a competição entre combustível e alimentos (SOUSA, 2014). Os materiais lignocelulósicos são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera, compondo cerca de 50% da biomassa terrestre (ALMEIDA, 2009).

Os combustíveis de terceira geração utilizam como substrato da fermentação etanólica a biomassa de microalgas, micro-organismos capazes de ostentar produções anuais de carboidratos dezenas ou centenas de vezes maiores que biomassas de primeira ou segunda geração (KLEIN, 2013). E a proposta dos de quarta geração é a modificação genética da planta para que sejam capazes de promover a captação com maior eficiência de carbono e armazenar em sua estrutura para que posteriormente este carbono seja convertido em combustível e gases por meio de técnicas de segunda geração (BRANDÃO, 2011).

2.2 Matérias-primas para produção de etanol

Qualquer matéria que tenha em sua composição açúcar ou outro carboidrato serve como matéria-prima para produção de etanol. De acordo com o tipo de

carboidratos presentes nas matérias-primas elas podem ser classificadas em três grupos diferentes: os materiais açucarados, que contêm açúcares simples tais como sacarose, glicose, frutose e lactose e são exemplos cana-de-açúcar, beterraba açucareira, melaços, mel de abelhas e frutas; os materiais amiláceos que contêm carboidratos como o amido e assim há a necessidade de uma hidrólise para conversão deste em glicose (milho, sorgo, cevada e trigo são exemplos destes materiais); e os lignocelulósicos, provenientes de vegetais que necessitam de pré-tratamento físico e químico vigorosos para obtenção de etanol, como palha, madeira, bagaço, casca e palha de arroz, arundo, entre outros (BARCELOS, 2012). Na Figura 1 estão representadas as rotas tecnológicas para produção de etanol.

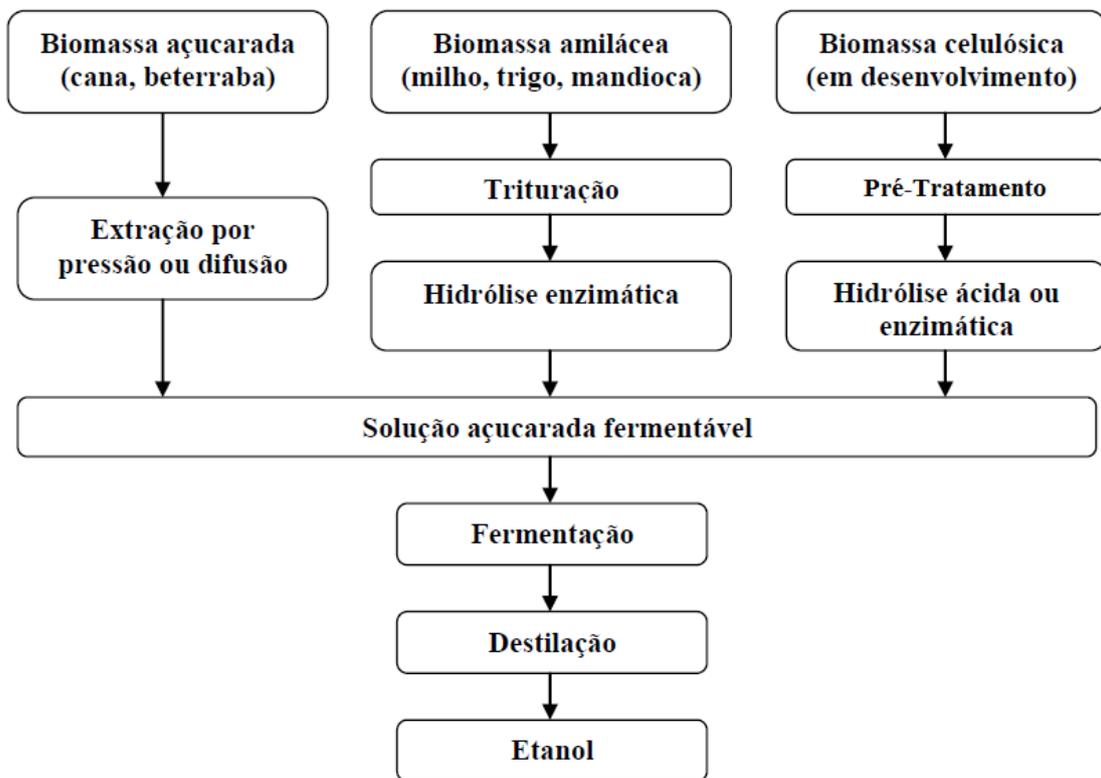


Figura 1: Rotas tecnológicas para produção de etanol

Fonte: adaptado de Silva, 2009.

2.2.1 Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma planta da família das gramíneas. É um dos cereais mais consumidos no mundo, perde apenas para o milho e o trigo. No Brasil, o cultivo de arroz irrigado, a região sul contribui com 77% da produção nacional

(BRASIL, 2014), com o ressaltado para o Rio Grande do Sul como o maior produtor brasileiro (LUDWIG, 2004).

As projeções de produção de arroz mostram que o Brasil irá colher 14 milhões de toneladas de arroz na safra 2023/2024, isso equivale ao aumento anual da produção de 11,3% nos próximos 10 anos (BRASIL, 2014). Com esse aumento na produção, aumentará também a quantidade de resíduos provenientes da produção de arroz, gerando principalmente farelo com 8% da produção, casca com 20% (BEVILAQUA, 2010) e palha com 23% (NUNES et al., 2013).

O farelo na maioria das vezes é aproveitado na fabricação de farinhas, alimentação animal e fermentação de cerveja. Já a casca e a palha são os resíduos mais preocupantes deste beneficiamento, pois são resíduos gerados em grande escala e seus destinos não são os mais adequados, muitas vezes são utilizados apenas para queima em caldeiras (BEVILAQUA, 2010).

Por ser um grande produtor de arroz irrigado e conseqüentemente por ter grande disponibilidade de resíduos (palha e casca) gerados pelo beneficiamento do grão, o Rio Grande do Sul tem um grande potencial para produção de etanol de segunda geração, visto que, a matéria-prima utilizada para esta produção é a biomassa lignocelulósica.

2.2.2 Arundo

O *Arundo donax* L. também conhecido como cana-do-reino é uma planta que pertence a família das gramíneas e se adapta bem em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (VASCONCELOS, GOMES e CORRÊA, 2007). É uma espécie originária no Mediterrâneo e uma planta de grande porte, com caules longos e ocos, podendo medir entre 2 a 6 m de altura, não passando dos 10 metros e 2 a 3,5 cm de diâmetro (SANTOS, 2009).

Esta planta pode atingir de 20 a 100 toneladas de massa seca por hectare em condições ótimas para seu crescimento, e constitui uma rica fonte de biomassa e fibras (ZANETTI, 2007). O arundo apresenta um grande potencial para produção de etanol de segunda geração, por ser uma planta que se adapta facilmente em

qualquer condição ambiental, tem um crescimento rápido e uma produtividade elevada (LEMONS E SILVA et. al, 2015).

2.3 Características estruturais dos materiais lignocelulósicos

As fontes renováveis mais encontradas na natureza são as biomassas lignocelulósicas (CASTRO e PEREIRA JR., 2010) assim tornando-se atrativas para produção de etanol de segunda geração. Podemos dividir os materiais lignocelulósicos em seis grupos, os que compreendem os resíduos de agricultura (bagaço de cana, palha de milho, palha de trigo, palha e casca de arroz, palha de cevada, bagaço de sorgo, caroços de azeitona e celulose), coníferas e folhosas, resíduos de celulose (papel de jornal, papel de escritório), biomassa herbácea (feno, gramíneas) e resíduos municipais sólidos (BARCELOS, 2012).

Essas biomassas são constituídas por três principais polímeros, lignina, hemicelulose e celulose (Figura 2) (SOUSA, 2014). Este conjunto é chamado de microfibrila celulósica e estão unidos por ligações covalentes. Estas frações conferem aos materiais lignocelulósicos uma estrutura rígida e cria uma barreira resistente ao ataque de microrganismos e/ou enzimas (FERREIRA, 2010). São encontrados cerca de 40-60% de celulose, 20-40% de hemicelulose e 15-25% de lignina (PEREIRA Jr. et al., 2008), porém a proporção destes componentes pode variar dependendo da espécie da planta, idade, tempo de colheita e condição ou estágio de crescimento (BARCELOS, 2012). Por este motivo se faz necessário conhecer a estrutura e as características dos principais componentes da biomassa lignocelulósica: celulose, hemicelulose e lignina.

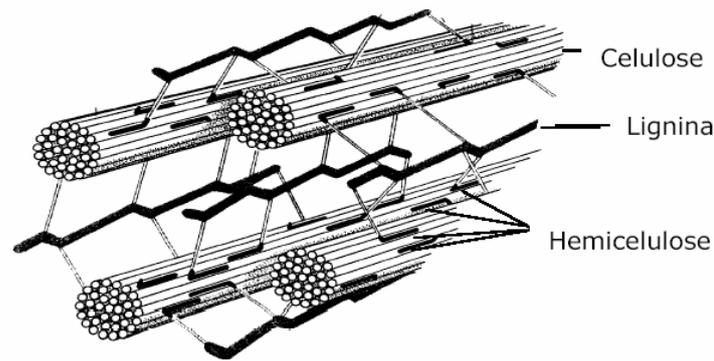


Figura 2: Polímeros constituintes dos materiais lignocelulósicos

Fonte: Pereira Jr. 2004.

A estrutura das células vegetais pode ser dividida em membrana plasmática, lamela média e parede celular (ALVES, 2011). Na parede celular é onde se encontra grande parte do material lignocelulósico (Figura 3) e é formada por uma rede de microfibrilas de celulose, que se encontram dispostas como espirais, de forma a conferir força e flexibilidade ao material, entrelaçadas por fios de hemicelulose, que atua como um elo químico entre a celulose e a lignina formando assim a rede fibrosa. Já entre lamela média e a membrana plasmática é encontrada a lignina, cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos (CASTRO e PEREIRA, 2010).

A obtenção de etanol de segunda geração é muito complexa, principalmente devido à alta proteção da lignina a estrutura celulósica, isso porque essa proteção acaba dificultando a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentáveis e sua posterior fermentação (RABELO, 2010). Assim são utilizadas tecnologias complexas, com elementos ácidos e/ou enzimáticos para desagregação dos açúcares e a remoção da lignina (SILVA, 2010).

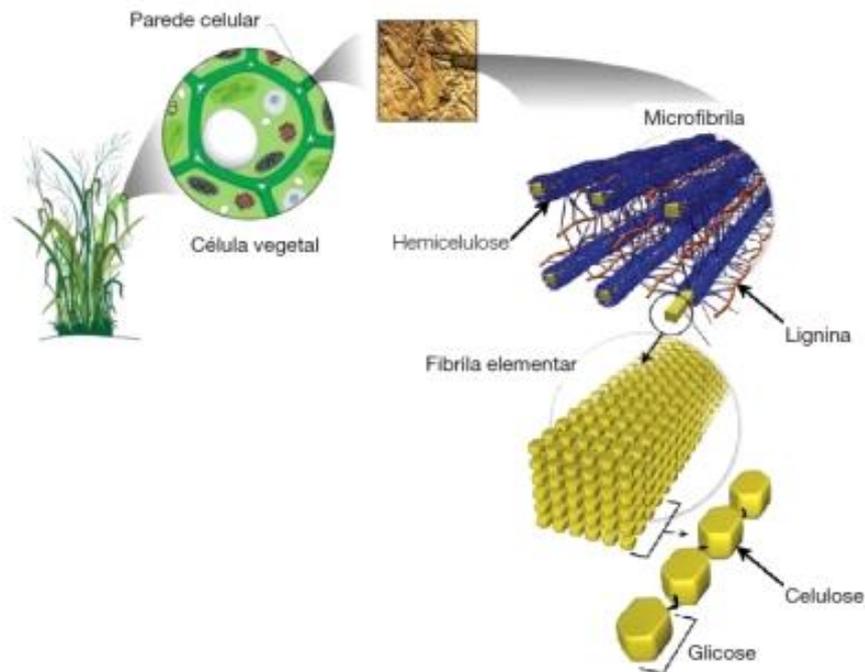


Figura 3 – Estrutura da parede celular de vegetais

Fonte: SANTOS et al., 2010

2.3.1 Celulose

A celulose é um polissacarídeo, de cadeia longa, constituída por um único tipo de unidade de açúcar e com uma estrutura relativamente simples (GUTIMANIS, 2008). Podemos definir como sendo um polímero, onde cada microfibrila é formada por diversas unidades de glicose (monômero) e celobiose unidas por ligações do tipo glicosídicas β -1,4 (Figuras 4) (ALVES 2011; ARANTES, 2009).

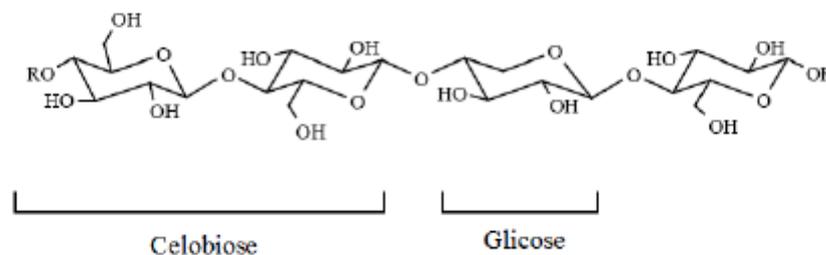


Figura 4: Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular

Fonte: Santo et al., 2012.

A celulose é encontrada na forma de microfibrilas e apresenta uma região bem estruturada denominada regiões cristalinas e uma região menos organizada

chamada de amorfa (Figura 5) (PEREIRA Jr. et al., 2008). Por apresentarem ligações muito mais fortes, a celulose é mais resistente à degradação química e biológica, do que a hemicelulose.

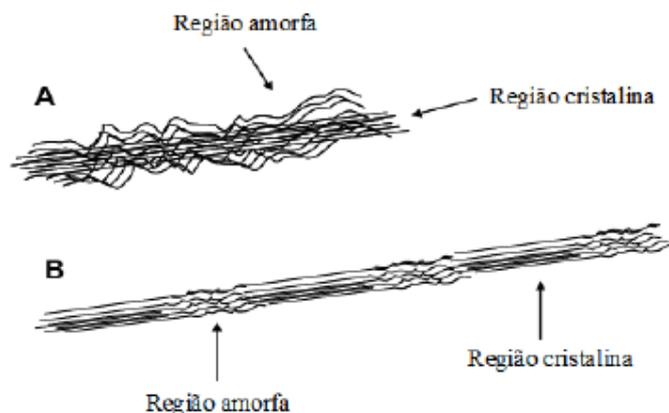


Figura 5: Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila. A: celulose cristalina está no centro da microfibrila e é envolta pelo substrato amorfo. B: As regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal

Fonte: Rabelo, 2010.

2.3.2 Hemicelulose

Estas macromoléculas, ao contrário de celulose, são formadas por uma estrutura complexa de carboidratos poliméricos, de cadeia mais curta e ramificada e não apresentam regiões cristalinas (ALVES, 2011; PEREIRA et al. 2008). Eles são constituídos, na sua grande maioria, de vários tipos de unidades de açúcares como pentoses (xilose, manose, arabinose, galactose) e ácidos urônicos (ácido galactourônico e glucurônico) (PITARELO, 2007).

Por não apresentarem uma estrutura cristalina, são mais susceptíveis à hidrólise química em condições mais brandas. As variedades de ligações e ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribuem para a estrutura da hemicelulose a complexidade e as suas conformações diferentes (PEREIRA *et al.*, 2008)

Na tabela 1 segue as principais diferenças entre a celulose e a hemicelulose.

Tabela 1: Diferenças entre celulose e hemicelulose

| CELULOSE | HEMICELULOSE |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Unidades de glicose ligadas entre si | Unidades variadas de açúcares |
| Grau de polimerização elevado | Grau de polimerização baixo |
| Forma arranjo fibroso | Não forma arranjo fibroso |
| Forma regiões amorfas e cristalinas | Forma somente regiões amorfas |
| Atacada lentamente por ácido mineral | Atacada rapidamente por ácido mineral |
| Diluído a quente | Diluído a quente |
| Insolúvel em álcali | Solúvel em álcali |

Fonte: PEREIRA *et al.*, 2008

2.3.3 Lignina

Depois da celulose, a lignina é o polímero mais abundante e importante nas plantas. A lignina é uma macromolécula que apresenta uma forma tridimensional, ramificada, altamente complexa, composta por unidades p-propilfenol (PEREIRA et al.,2008). A lignina não tem estrutura cristalina e por este motivo é considerado um polímero amorfo, cuja estrutura principal, provém da polimerização de três monômeros que se diferem pela substituição que apresentam no anel aromático, são eles: o álcool cumárilico, álcool coniferílico e o álcool sinapílico (Figura 6) (RABELO; SILVA, 2010).

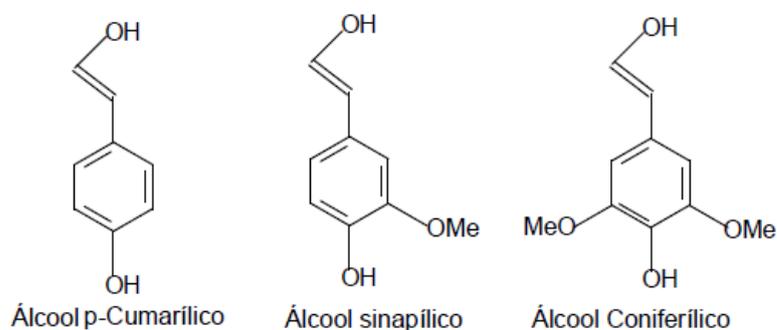


Figura 6: Alcoóis formadores da molécula de lignina

Fonte: Bevilqua, 2010.

A lignina proporciona firmeza e rigidez ao conjunto de fibras de celulose, além disso, confere a planta resistência ao ataque de microrganismos e dificulta a degradação da celulose e hemicelulose. Devido a sua grande complexidade estrutural, a lignina é considerada como uma barreira à ação das celulasas e hemicelulasas (enzimas responsáveis pela degradação da celulose e hemicelulose, respectivamente) (FERREIRA, 2010).

2.4 Etapas de produção do etanol de segunda geração

As principais etapas do processo de produção de bioetanol são pré-tratamento, hidrólise e a fermentação (Figura 7). A biomassa por apresentar uma estrutura complexa e compacta faz com que seja necessário submeter à mesma a pré-tratamentos físicos e/ou químicos antes da hidrólise para produção de etanol. Essa hidrólise pode ser feita de diversas maneiras, tanto por processos que utilizam ácidos, solventes orgânicos ou enzimas. Por fim, na etapa de fermentação, o hidrolisado sofre a ação das leveduras, com a transformação dos açúcares em etanol, CO₂ e outros sub-produtos em menores quantidades. (RABELO, 2010)

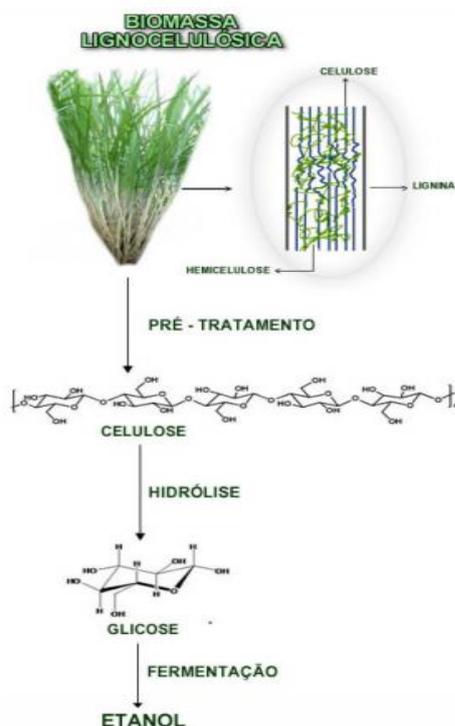


Figura 7: Representação esquemática da produção de etanol de biomassa lignocelulósica

Fonte: Santos et al., 2012.

2.4.1 Pré-tratamento

O pré-tratamento tem por objetivo facilitar o acesso das enzimas que melhoram a digestibilidade da celulose (NUNES *et al.*, 2013). Esta etapa é importante, pois a lignina limita o processo de hidrólise, ou seja, oculta a superfície celulósica impedindo o acesso das enzimas as fibras. Por esse motivo, acaba tornando-se necessária uma etapa de pré-tratamento, tanto a fim de quebrar a estrutura cristalina da celulose quanto a fim de remover ou alterar a lignina e a hemicelulose, assim expondo as fibras de celulose e facilitando à ação enzimática. (OGEDA e PETRI, 2010). A Figura 8 demonstra o que ocorre com a biomassa na etapa de pré-tratamento.

Existem vários métodos de pré-tratamento: os físicos (redução do tamanho das partículas), químicos (álcalis, ácidos, solventes, gases, outros), biológicos (enzima ou fungos) ou a combinação destes. O método que tem chamado atenção das pesquisas são os químicos e combinados, visto que estes removem a lignina sem degradar celulose (SANTOS, 2012).

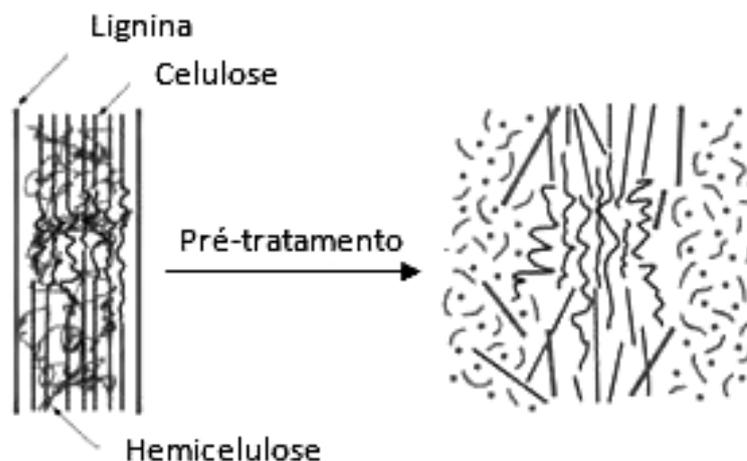


Figura 8: Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

Fonte: Adaptado de Chemmés et al., 2013.

2.4.2 Hidrólise

Na etapa de hidrólise, devido a ajuda de determinados catalisadores, ocorre a quebra das cadeias de polissacarídeos, tendo como resultado moléculas de açúcar

(RABELO, 2010). Dessa forma, o processo de hidrólise é responsável por quebrar a celulose em várias moléculas de glicose a fim de permitir sua fermentação e a produção de biocombustível (SOUSA, 2014).

O processo de hidrólise pode ser químico ou enzimático (NETO, 2009). Na hidrólise química é utilizado ácido, que pode ser concentrado ou diluído, normalmente é utilizado ácido sulfúrico ou ácido clorídrico. No entanto esse método gera hidrolisado de alta toxicidade, o que dificulta o metabolismo dos microrganismos agentes dos processos fermentativos (PEREIRA *et al.*, 2008). Além disso, na hidrólise com ácido concentrado devemos ter equipamentos altamente resistentes a corrosão, o que aumenta consideravelmente o custo do processo. Como a hemicelulose é hidrolisada antes da celulose, os açúcares liberados pela hemicelulose acabam ficando expostos por muito tempo o que resulta na sua degradação e perda de açúcar no processo (RABELO, 2010).

No processo enzimático de hidrólise, a celulose é quebrada pela ação das enzimas celulasas (endoglucanase e exoglucanase), que quebram a celulose em celobiose, e em seguida, esta é convertida em duas moléculas de glicose pela β -glucosidase (MENDES, 2010). Por ser um processo menos agressivo, ocorre uma menor degradação dos açúcares comparada com a hidrólise ácida, proporcionando com que o processo de fermentação tenha um alto rendimento (NETO, 2009). Porém a grande dificuldade que vem sendo enfrentada é o elevado custo das enzimas e por serem extremamente sensíveis, tornando necessário o controle rigoroso de diversos parâmetros. Na Tabela 2 estão especificadas as condições de cada processo e seus desempenhos aproximados e na Tabela 3 as principais diferenças entre a hidrólise ácida e a enzimática.

Tabela 2: Comparação das condições e desempenho dos três processos de hidrólise

| | Consumo | Temperatura (°C) | Tempo | Rendimento de glicose (%) |
|-------------------|---------------------------------------|-----------------------------|--------------|--------------------------------------|
| Ácido diluído | <1% H ₂ SO ₄ | 215 | 3 min | 50-70 |
| Ácido concentrado | 30-70% H ₂ SO ₄ | 40 | 2-6 h | 90 |
| Enzimática | Celulase | 50 | 1,5 dias | 75-95 |

Fonte: RABELO, 2010

Tabela 3: Comparação entre hidrólise ácida e enzimática de biomassa lignocelulósica para produção de etanol

| Parâmetro | Hidrólise ácida | Hidrólise enzimática |
|-------------------------|--|--|
| Pré-tratamento | Pode ser necessário | Necessária |
| 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: AGUIAR, 2010.

2.4.3 Fermentação

Na etapa de fermentação, o hidrolisado sofre a ação das leveduras, com o objetivo de transformar de forma anaeróbica os açúcares em etanol e CO₂, e pode ser demonstrada pela reação apresentada na figura 9. É um processo biológico no qual a energia fornecida por reações de oxidação parcial é utilizada para o crescimento dos microrganismos e a oxidação anaeróbia dos açúcares utilizada para formação de etanol e dióxido de carbono (PROMPT, 2012)

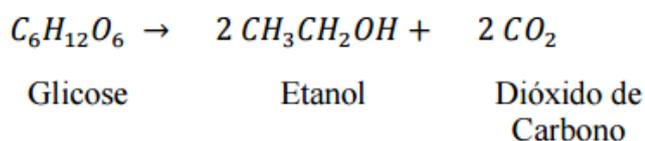


Figura 9: Reação global da fermentação alcoólica

Fonte: Prompt, 2012.

A obtenção do etanol a partir dos materiais lignocelulósicos pode ser realizada de quatro maneiras diferentes, são elas: Bioprocesso consolidado (CBP - consolidated bio processing), Sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF -

simultaneous saccharification and cofermentation), Hidrólise separada da fermentação (SHF – separate hydrolysis and fermentation) e Fermentação e sacarificação simultânea (SSF – simultaneous saccharification and fermentation) (PITARELO, 2013)

No método CBP ocorre três etapas em um único equipamento, desta maneira se faz necessário obter microrganismos que consigam produzir enzimas que quebrem as frações de hemicelulose e celulose e com alta habilidade fermentativa, tanto de pentoses quanto hexoses. Para o SSCF já nesse processo as etapas de hidrólise e fermentação das pentoses e hexoses são realizadas em um mesmo reator, sendo geralmente necessário o auxílio da biologia molecular para o desenvolvimento de microrganismos capazes de fermentar pentoses e hexoses (VASQUEZ, 2007).

Já para SHF ocorre a hidrólise e em seguida o processo de fermentação, ou seja, esses processos são realizados em reatores diferentes, uma vez terminada a hidrólise, o resíduo sólido é separado e o sobrenadante é empregado para fermentação por leveduras. Dessa maneira a etapa de hidrólise pode ser realizada química ou enzimaticamente. Porém esse método apresenta uma grande desvantagem que é a possibilidade de contaminação da solução, já que é o tempo envolvido na etapa de hidrólise é longo o que torna a solução uma fonte disponível para os microrganismos indesejados (SANTOS, 2010).

No caso do SSF a fermentação da glicose e a sacarificação da celulose são realizadas no mesmo reator (FERREIRA, 2010). A hidrólise é realizada enzimaticamente, evitando assim a formação de inibidores porque todos os açúcares que são gerados são simultaneamente consumidos pelos microrganismos fermentativos para produção de etanol. Porém a desvantagem é que a enzima e a levedura desempenham sua função em temperaturas e pH diferentes o que prejudica o processo (PITARELO, 2013).

3. METODOLOGIA

3.1 Preparo da amostra

Para este trabalho foi selecionado as biomassas de *Arundo donax* L (planta inteira) e *Oriza sativa* L., cultivar Puitá. (casca e palha de arroz).

As biomassas de arroz pré-tratadas foram adquiridas do trabalho realizado por Farias et al. (2014) onde o pré-tratamento ácido foi feito com H₂SO₄ 1,1% e alcalino com NaOH 0,5 M.

3.2 Caracterização da biomassa

A análise para caracterização química das biomassas *in natura* e pré-tratadas foi feita de acordo com a metodologia descrita por DUNNING e DALLAS (1949) que se fundamenta na sacarificação quantitativa dos polissacarídeos de diferentes matérias-primas vegetais.

Foram pesadas separadamente em balança analítica 2,0 gramas de amostra previamente seca em estufa durante 24 horas e peneiradas afim de selecionar as frações granulométricas reduzidas (utilizou-se peneiras de 32 mesh). As amostras foram transferidas para béqueres de 100 mL e adicionados 10 mL de ácido sulfúrico 72% v/v. A mistura foi levada para banho-maria a 45 °C por 7 minutos e agitada constantemente com bastão de vidro. Após esta etapa as amostras foram transferidas para erlenmeyers de 500 mL e adicionado 275 mL de água destilada. Os frascos foram fechados com papel alumínio e levados para autoclavar por 30 minutos a uma temperatura de 121 °C. Depois de retirados do autoclave e esfriados a temperatura ambiente, as amostras foram filtradas a vácuo com o objetivo de separar a fração sólida da líquida. A fração sólida foi colocada em cadinhos de porcelana (previamente secos e pesados) e a fração líquida foi transferida para balão volumétrico de 500 mL, o qual teve seu volume ajustado com água destilada.

Para determinação da lignina a fração sólida foi seca em estufa a temperatura de 100 °C por 24 horas e em seguida pesada em balança analítica (W1). Logo após

a amostra foi calcinada a 550 °C. Depois de resfriado, os cadinhos foram pesados (W2).

Já a fração líquida foi utilizada para determinação da concentração de glicose (C1) e açúcares redutores totais (C2) utilizando os métodos enzimáticos de glicose oxidase (kit enzimático) e DNS (Ácido 3,5 – dinitro salicílico).

3.3 Hidrólise Enzimática

A hidrólise foi feita de acordo com o trabalho realizado por LEMONS E SILVA et al. (2015) com algumas modificações. Foram pesados 7 gramas de cada biomassa pré-tratada e transferidos para elenmeyers de 250 mL, em seguida foram autoclavados a 111 °C por 15 minutos. Depois foram adicionados 70 mL de solução tampão e 10FPU/g de complexo de celulases. As amostras foram colocadas em uma incubadora à temperatura de 50 °C com agitação orbital de 200 rpm durante 48 horas. Durante o processo foram feitas coletas em 6, 24 e 48 horas para análise de açúcares redutores e glicose. Ao término do tempo de reação o material foi transferido para tubos falcon e centrifugados a 2500 rpm com o objetivo de separar o material sobrenadante.

3.4 Fermentação

A fermentação também foi realizada de acordo com o trabalho de LEMONS E SILVA et al. (2015) com modificações. Foram medidos 30 mL do hidrolisado resultante do processo de hidrólise, transferidos para elenmeyers de 250 mL e adicionados 1,25 g/L de ureia, 1,1 g/L de fosfato, 2 g/L de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, 40 mL/L de solução de sais e tampão citrato 50 n M em pH 5. As amostras foram colocadas em uma incubadora com agitação orbital de 200 rpm, temperatura de 37°C por 22 horas. Foram realizadas coletas em 1 hora, 2, 3, 4, 19 e 22 horas após o início do processo. Em seguida as coletas que foram retiradas durante o processo foram preparadas para análise de cromatografia líquida de alta eficiência.

3.5 Análises

3.5.1 Caracterização das biomassas

Os valores de celulose, hemicelulose e lignina foram calculados a partir das equações descritas por SLUITER et al. (2005).

3.5.1.1 Celulose

O teor de celulose foi calculado pela equação 1:

$$\text{Celulose (\% m/m)} = \left(\frac{0,9}{0,96} \right) \times (C_1) \times (V/m) \times (100) \quad \text{Eq. 1}$$

Onde 0,90 = coeficiente que resulta da relação entre peso molecular do polímero e do monômero de glicose; 0,96 = rendimento da sacarificação; C1 = concentração de glicose (g/L); v = volume total da solução de açúcar (L) e m = peso da amostra seca (g).

3.5.1.2 Hemicelulose

O teor de hemicelulose foi calculada pela equação 2:

$$\text{Hemicelulose (\% m/m)} = \left(\frac{0,88}{0,93} \right) \times (C_2 - C_1) \times (V/m) \times (100) \quad \text{Eq. 2}$$

Onde 0,88 = coeficiente que resulta da relação entre peso molecular do polímero e do monômero; 0,93 = rendimento da sacarificação; C1 = concentração de glicose (g/L); C2 = concentração de açúcares redutores (g/L); v = volume total da solução de açúcar (L) e m = peso da amostra seca (g).

3.5.1.3 Lignina

O teor de lignina foi calculado pela equação 3:

$$\text{Lignina (\% m/m)} = \left(\frac{W_1 - W_2}{m} \right) \times (100) \quad \text{Eq.3}$$

Onde W1= Resíduo seco da filtragem (g); W2= Peso do resíduo após calcinação (g) e m = peso da amostra seca (g).

3.5.2 Hidrólise

Com as amostras de hidrolisado coletas no processo de hidrólise foram feitas as análises de glicose e açúcares redutores.

3.5.2.1 Método enzimático de glicose oxidase (C1)

Para determinação de glicose foram adicionados 10 µL de amostra em tubos eppendorff de 2 mL, em seguida adicionado 1 mL de reagente GOD (Kit enzimática AA Wiener Lab.) aos tubos e homogeneizados. Os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C durante 15 minutos e logo após, adicionado 1 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 505 nm ($\lambda = 505 \text{ nm}$).

3.5.2.2 Método para determinar a concentração de açúcares redutores totais (C2)

Foram retirados 100 µL de amostra da fração líquida que foi separada anteriormente e colocados em tubos *eppendorff* de 2 mL. Em seguida foram adicionados 300 µL de solução DNS aos tubos e homogeneizados. Em banho-maria fervente foram colocados os tubos durante 5 minutos e depois de retirados, foram resfriados em banho de gelo e acrescentados aos tubos 1 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm ($\lambda = 540 \text{ nm}$).

3.5.3 Fermentação

3.5.3.1 Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC)

Das amostras coletadas no processo de fermentação foram retirados 500 µL e diluídas em balões volumétricos de 5 mL com água ultra pura. As diluições foram filtradas com o auxílio do filtro SEP PAK C18 e transferidas para vials devidamente identificados.

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo SHIMADZU equipado com detector de índice de refração. A fase móvel utilizada foi H₂SO₄ 5nM (filtrada com membrana de éster de celulose 0,45 µm), fluxo 0,6 mL/min, volume de injeção de 20 µL, temperatura do forno de 45°C.

As análises de cromatografia foram realizadas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, no laboratório de Química analítica Ambiental.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização das biomassas

Devemos conhecer detalhadamente a biomassa a ser utilizada em um processo, pois são essas características que irão fornecer informações importantes para determinar o tipo de processo e métodos a ser utilizado, além de detectar variabilidade em determinado tipo de matéria-prima, para possibilitar a otimização do processo e para calcular os custos de produção, entre outras vantagens. (OLIVEIRA, 2013).

Os resultados de composição química das biomassas *in natura* analisadas são apresentados na Tabela 4. Em percentagem a quantidade de celulose e hemicelulose é semelhante. Para o arundo e casca de arroz, a fração de hemicelulose foi superior a de celulose, o que mostra que pode ser interessante utilizar essa fração para produção de etanol, já que em sua composição há uma grande quantidade de açúcares. Para a maioria das espécies a fração de celulose é maior que a de hemicelulose.

Tabela 4: Composição química das biomassas *in natura* de arundo, palha e casca de arroz.

| | CELULOSE (%) | HEMICELULOSE (%) | LIGNINA (%) |
|----------------|---------------------|-------------------------|--------------------|
| Arundo | 32,3 | 41,52 | 20,89 |
| Casca de Arroz | 30,36 | 31,17 | 21,20 |
| Palha de Arroz | 36,98 | 36,87 | 13,34 |

No estudo realizado por HICKERT (2010) foi encontrado 34% celulose, 13% hemicelulose e 20% lignina para a casca de arroz. ROBERTO et al. (2003) encontrou para palha de arroz valor de celulose maior que encontrado neste trabalho, sendo 43% de celulose, 22% hemicelulose e 17% lignina, enquanto que neste foi encontrado 36,98%, 36,87% e 13,34% respectivamente.

Já no trabalho realizado por LEMONS e SILVA et al. (2015) a composição química para o arundo foi de 31,10% celulose, 35,27% hemicelulose e 18,5% de lignina. Apesar dos valores encontrados para fração celulósica e lignina serem próximos, a hemicelulose neste trabalho foi maior do que encontrado por Lemons e Silva et al. Essas diferenças de valores podem ocorrer devido a variabilidade natural de composição química das matérias-primas ou época de colheita, ou seja, pode estar associado a origem da biomassa ou até mesmo o método de análise utilizado (CARMO, 2013).

Para as biomassas pré-tratadas, os valores de celulose, hemicelulose e lignina, estão representados na tabela 5. Podemos observar que a quantidade de celulose para as três biomassa aumentou em relação as biomassas *in natura* e a de hemicelulose e lignina diminuíram. Isto indica uma grande solubilização da fração hemicelulósica e de lignina, o que é desejável, já que neste estudo o objetivo é a produção de etanol de segunda geração através da fração celulósica.

Tabela 5: Composição química das biomassas pré-tratadas de arundo, palha e casca de arroz.

| | CELULOSE (%) | HEMICELULOSE (%) | LIGNINA (%) |
|----------------|---------------------|-------------------------|--------------------|
| Arundo | 69,48 | 15,55 | 10,17 |
| Casca de Arroz | 62,43 | 22,70 | 14,79 |
| Palha de Arroz | 78,42 | 16,08 | 5,32 |

A fração de hemicelulose se torna mais suscetível a hidrólise no pré-tratamento ácido por apresentar caráter relativamente amorfo e grau de polimerização inferior ao da celulose. Além disso, o pré-tratamento ácido diluído tem a vantagem de não apenas solubilizar a hemicelulose, mas também de convertê-la em açúcares fermentáveis de baixo peso molecular, o que elimina ou reduz a necessidade de se utilizar a enzima hemicelulase nos complexos enzimáticos durante a etapa de hidrólise enzimática (SANTOS, 2009).

Como as frações de hemicelulose e lignina diminuíram isso pode refletir em uma melhora na conversão enzimática da celulose dessas biomassas, já que essas frações formam uma camada protetora ao redor da celulose, reduzindo assim a eficiência do ataque enzimático.

4.2 Hidrólise enzimática

Na hidrólise enzimática a celulose é quebrada por enzimas chamadas genericamente de celulasas. Essas enzimas realizam a quebra das ligações químicas existente na celulose resultando em moléculas de glicose. (FRADE, 2011).

Na figura 10 está representado a formação de açúcares na hidrólise de cada biomassa ao longo do tempo. Podemos notar que houve um aumento da concentração de glicose com o decorrer do tempo, passando de 28,5 mg/mL (palha), 22,4 mg/mL (casca) e 19,5 mg/mL (arundo) com 6 horas de processo para 60,5 mg/mL, 29,3 mg/mL e 31,7 mg/mL respectivamente no final do processo com 48 horas. Porém podemos notar que entre 24 e 48 horas o aumento na concentração de glicose foi quase que constante para o arundo e palha de arroz. Isso ocorre devido ao fato de que a quantidade de substrato disponível para enzima diminuiu, fazendo com que ocorra a diminuição da taxa de produção de açúcar (glicose). Esse comportamento também foi verificado no estudo realizado por WANDERLEY (2012), que utilizou o bagaço da cana-de-açúcar para as análises obtendo em 48 horas de hidrólise o pico máximo de concentração de glicose, após esse tempo a concentração se manteve praticamente constante.

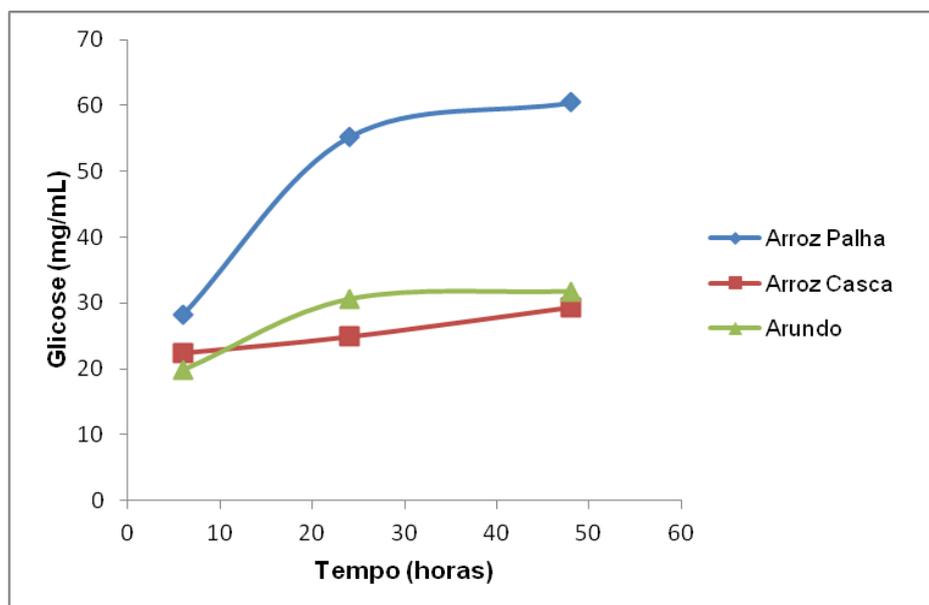


Figura 10: Concentrações de glicose para as diferentes biomassas analisadas em relação ao tempo de hidrólise enzimática.

As concentrações de açúcares redutores totais obtidas na hidrólise das biomassas de arundo, palha e casca de arroz estão representadas na figura 11. Observa-se que conforme o tempo de hidrólise aumenta, as concentrações destes açúcares também aumentam. Em 6 horas de hidrólise a concentração de açúcares foi de 44,8 mg/mL para palha, 26,1 mg/mL para casca de arroz e 19,9 mg/mL para o arundo, já em 48 horas a concentração foi de 84,46 mg/mL, 37,1 mg/mL e 47,7 mg/mL respectivamente.

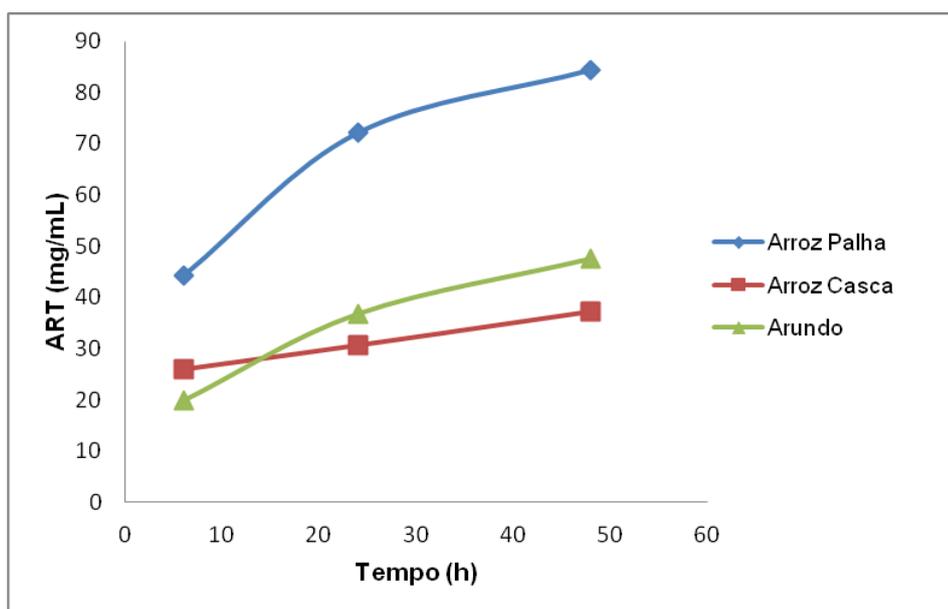


Figura 11: Concentrações de açúcares redutores das diferentes biomassas analisadas em relação ao tempo de hidrólise enzimática.

Verificamos ainda que entre as três biomassas analisadas, tanto para açúcares redutores totais quanto para glicose, a biomassa que mais liberou açúcar no hidrolisado foi a palha de arroz, chegando ser o dobro das concentrações dos açúcares encontrados nas outras biomassas. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que a palha apresentou maior percentagem de celulose na composição química da biomassa pré-tratada comparada ao arundo e a casca de arroz, cerca de 78%. A palha de arroz pré-tratada também apresentou uma menor quantidade de lignina (5%), o que é desejável, visto que a fração de lignina é considerada como uma barreira física à ação das celulases (enzimas responsáveis pela quebra da celulose) (FERREIRA, 2010). As enzimas adsorvem irreversivelmente a superfície da lignina permitindo apenas que pequenas quantidades destas enzimas sejam adsorvidas na celulose.

4.3 Fermentação

No processo de fermentação, após a hidrólise (processo SHF), as concentrações encontradas de glicose, xilose e etanol estão apresentados nas figuras 12, 13 e 14 para arundo, palha e casca de arroz, respectivamente. Observamos que tanto para o arundo quanto para palha e casca de arroz conforme a concentração de etanol aumenta, a de glicose diminui. Isso ocorre porque a levedura fermenta a glicose transformando em álcool.

A vantagem de se usar o método SHF é que as temperaturas da hidrólise enzimática e da fermentação podem ser otimizadas. Assim, conseguimos obter maiores desempenho tanto da enzima quanto da levedura (SANTOS, 2010). As celulases comumente apresentam maior atividade catalítica em temperatura acima de 50°C, bem acima da temperatura ideal para a etapa fermentativa (MAEDA, 2010).

Na figura 12 podemos observar que no início do processo fermentativo tínhamos uma grande concentração de glicose e uma baixa produção de etanol. A máxima produção de etanol ocorreu no tempo de 19 horas, onde a concentração de açúcar era praticamente nula. Caso o processo ocorresse por mais tempo, não aumentaria a produção de etanol visto que não teríamos mais glicose para ser fermentada (no gráfico podemos observar este comportamento entre 19 e 24 horas).

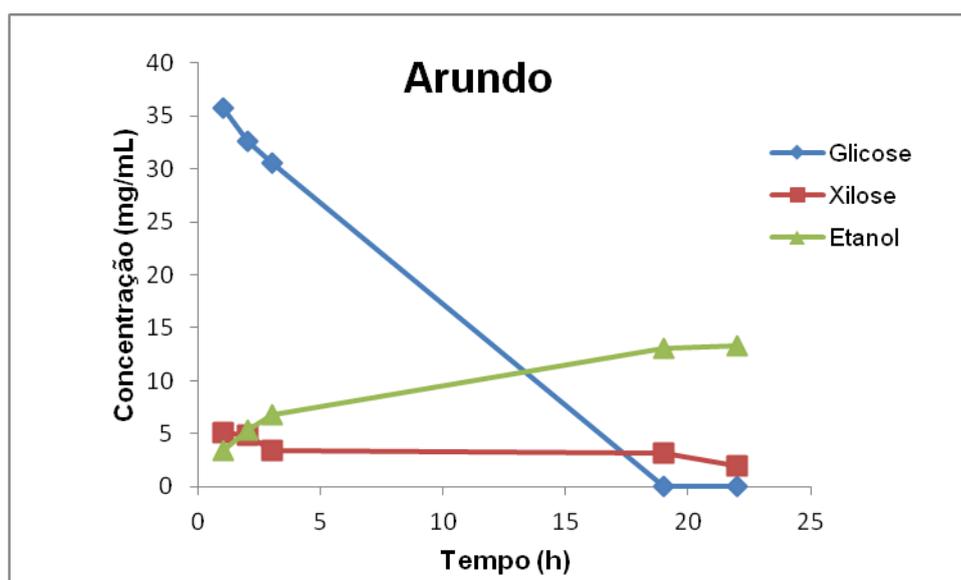


Figura 12: Concentração de glicose, xilose e etanol para biomassa de arundo durante o processo fermentativo.

O trabalho realizado por LEMONS E SILVA (2015) que analisa a produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa de arundo usando o método de SSF, o comportamento foi semelhante ao encontrado neste trabalho, porém a produção máxima de etanol analisada ocorreu no período de 80 horas. Essa diferença de resultados pode ser devido ao método utilizado diferente (SHF e SSF). A vantagem do método SSF é que a formação de inibidores é minimizada, já que todo o açúcar originado é simultaneamente consumido pelos microrganismos fermentativos (CARMO, 2013). Segundo MAEDA (2010), a remoção dos produtos de inibição da hidrólises enzimática e ainda provavelmente a mais importante razão para o uso do processo SSF, possibilitando maiores rendimentos na produção de etanol.

Observa-se que em 19 horas de processo quando a concentração de etanol era de 7,76 mg/mL, a de glicose era praticamente nula para casca de arroz (Figura 14), e após esse tempo a concentração de etanol começa a decair. No momento que toda a glicose é consumida, a eficiência de atuação da levedura diminui e a produção de etanol estabiliza. Com o passar do tempo, a taxa de fermentação diminui, e a levedura não tendo mais glicose para consumir, começa a consumir o etanol para manter sua sobrevivência.

O tempo de maior produção de etanol pode ser considerado baixo, bem como a concentração de etanol, comparado aos dados da literatura, porém estas concentrações foram obtidos a partir do hidrolisado, e uma parte dos açúcares pode ter sido perdida no processo de lavagem após o pré-tratamento.

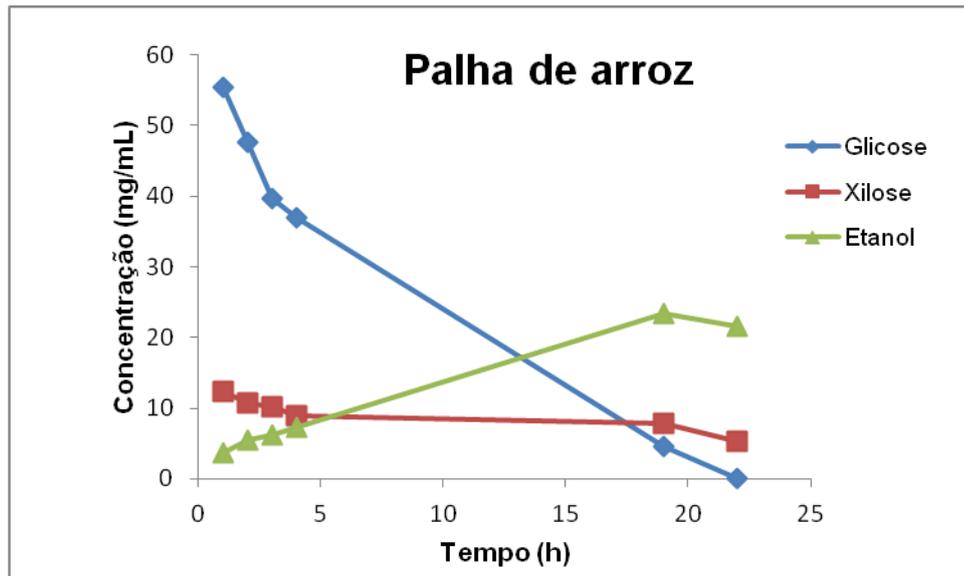


Figura 13: Concentração de glicose, xilose e etanol para biomassa de palha de arroz durante o processo fermentativo.

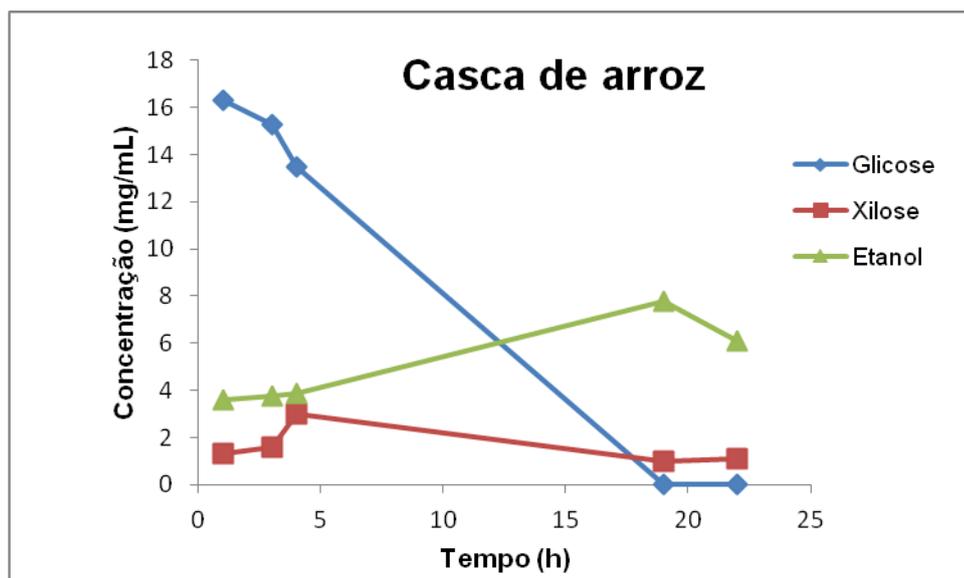


Figura 14: Concentração de glicose, xilose e etanol para biomassa de casca de arroz durante o processo fermentativo.

Podemos notar que a concentração de xilose no processo, para ambas as biomassas, não teve alterações significativas. Segundo o autor SANTOS (2010) isso ocorre porque a levedura *S. cerevisiae* não é capaz de fermentar este açúcar, ao contrário da glicose que é facilmente fermentável por essa levedura. Além disso, o pré-tratamento ácido, seguido de pré-tratamento alcalino visa retirar a fração hemicelulósica e a lignina, portanto, a baixa concentração de pentoses já era esperada.

4.4 Rendimento teórico

O rendimento teórico foi calculado a partir da concentração de etanol obtida na etapa de fermentação, o volume final do hidrolisado e a quantidade de biomassa utilizada no início do processo. Para as biomassas de arundo, palha e casca de arroz encontramos um rendimento teórico de 51,20 L/ton, 134,13 L/ton e 24,72 L/ton respectivamente (tabela 6). Observa-se que entre as biomassas analisada a palha de arroz apresentou maior rendimento em litros por tonelada, chegando a ser superior 61,82% em relação ao arundo e 81,57% em relação a casca. Porém, considerando a estimativa de rendimento de biomassa por área, verifica-se que o rendimento de etanol por hectare de arundo é bem superior ao de arroz. Estes dados nos permite inferir o potencial destas biomassas para produção de etanol de segunda geração.

Tabela 6: Estimativa e rendimento teórico de etanol.

| | Estimativa Rendimento da biomassa (t/ha) | Rendimento teórico de etanol (L/t) | Estimativa Rendimento etanol (L/ha) |
|----------------|--|---|--|
| Arundo | 50 ¹ | 51,20 | 2560 |
| Casca de arroz | 2 ² | 24,72 | 49,44 |
| Palha de arroz | 4 ² | 134,13 | 536,52 |

¹ Angelini et al. (2009); ² Inventário Energético de Resíduos Rurais (2014).

Esse valor elevado de rendimento em litros por tonelada para a palha pode ser explicado pela composição química desta biomassa. A palha de arroz apresentou uma maior quantidade de celulose, fração esta que é quebrada para a formação da glicose e depois de fermentada para produção do álcool, diferente da casca que apresentou uma menor quantidade de celulose e conseqüentemente uma menor concentração de açúcares fermentáveis.

A utilização de resíduos da lavoura como palha e casca de arroz como fonte de energia é uma vantagem, principalmente em relação à utilização da casca, que tem sido um problema ambiental sério na nossa região. Uma opção pode ser a

utilização conjunta da palha e casca, para aumentar o rendimento do processo fermentativo. Quanto à biomassa de arundo para produção de etanol de segunda geração, devemos considerar que esta é uma planta que ocorre de forma espontânea na nossa região, não compete com plantas de lavoura e também apresenta um alto rendimento de biomassa por hectare.

5. CONCLUSÃO

A caracterização da biomassa é de fundamental importância para avaliação do potencial de utilização dessas matérias-primas para a produção de etanol de segunda geração, principalmente para definição da fração (celulose e/ou hemicelulose) que será utilizada no processo.

Nas condições estudadas, usando somente a fração celulósica, a biomassa palha de arroz apresentou maior concentração de açúcares e conseqüentemente alto rendimento de etanol por massa, já o arundo, apresenta potencial em função da elevada produtividade de biomassa por área.

A utilização de biomassas para produção de etanol foi demonstrado e pode ser otimizado aplicando outras condições de pré-tratamento, hidrólise e fermentação, para que assim sejam atingidos rendimentos ainda mais elevados.

6. REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo Aspergillus Níger**. 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2010.

ALMEIDA, L. T. **A inserção dos biocombustíveis na matriz energética brasileira à luz do princípio da precaução**. 2009. 98 f. Monografia (Bacharel Direito) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

ALVES, R. E. **Caracterização de fibras lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas ópticas de alta resolução**. 2011. 115P. Dissertação (Mestrado) – Instituição de Física de São Carlos, Instituição de Química de São Carlos e Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ANGELINI, L.G.; CECCARINI, L.; NASSI O DI NASSO, N.; BONARI, E. Comparison of Arundo donax L. and Miscanthus x giganteus in a long-term field experiment in Central Italy: analysis of productive characteristics and energy balance. 2009. **Biomass Bioenergy**, 33, 635–643

ARANTES, T. M. **Uso de soluções hidrotrópicas na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar**. 2009. 147 f. Dissertação (Mestrado em Físico- Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

BARCELOS, C. **Aproveitamento das Frações Sacarínea, Amilácea e Lignocelulósica do Sorgo Sacarino [Sorghum bicolor (L.) Moench] para a Produção de Bioetanol**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BEVILAQUA, D. B. **Produção de ácido levulínico por meio de hidrólise ácida da casca de arroz**. 2010. 87p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, Brasil, 2010.

BRANDÃO, M. C. R. **Desenvolvimento tecnológico da biomassa: síntese e avaliação de biocombustíveis de segunda geração e aditivos melhoradores de cetano**. 2011. 162 f. Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Federal do Paraíba, João Pessoa, 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio Brasil 2013/2014 a 2023/2024 Projeções de longo prazo**. 5ª edição. Ano 2014. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/projecoes_2013-2014_2023-2024.pdf>. Acesso em 01 jun 2015.

BRASIL. Ministério da agricultura pecuária e desenvolvimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>>. Acesso em: 11 mar 2015.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Balanco energético nacional - BEN**. Rio de Janeiro: MME, 2014.

BRASIL, Ministério de Minas e Energia. **Inventário Energético de Resíduos Rurais**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em <<http://www.epe.gov.br/mercado/Documents/S%C3%A9rie%20Estudos%20de%20Energia/DEA%2015%20-%2014%20-%20Invent%C3%A1rio%20Energ%C3%A9tico%20de%20Res%C3%ADduos%20Rurais.pdf>> Acesso em 09 jul 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. 2012. **Biocombustíveis**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/clima/energia/energias-renovaveis/biocombustiveis>>. Acesso em 19 mar 2015.

CARMO, J. R. Produção de **etanol e pectinase por Kluyveromyces marxianus CCT 4086 utilizando resíduos do processamento de café (Coffea arábica L.)**. 2013. 253 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras/UFLA - Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, 2013.

CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 1-12, 2010.

CHEMMÉS, C. S.; SILVA, F. C.; SOUZA, L.S.; JUNIOR, R. A. A.; CAMPOS, L. M. A. **Estudo de métodos físico-químicos no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração.** XII SEPA - Seminário Estudantil de Produção Acadêmica, UNIFACS, 2013. Disponível em: <<http://www.revistas.unifacs.br/index.php/sepa>>. Acesso em 13 jun 2015.

DUNNING, J.W., DALLAS, D. E. Analytical procedures for control of saccharification process. **Analytical Chemistry**, Washington, v.21, n.6, p. 727- 729, 1949.

FARIAS, S. P.; LEMÕES, J. S.; LEMONS E SILVA, C. F.; MESSIAS, R. S.; RUIZ, W. A. **Perda de massa de casca de arroz, palha de arroz e Arundo donax I. Submetidos à pré-tratamento químico.** 2014. Trabalho apresentado em V Simpósio estadual de agroenergia, Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2014.

FERREIRA, V. **Produção de β -glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração.** 2010. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

FILHO, J. B. S. **Produção de biodiesel etílico de óleos e gorduras residuais (ogr) em reator químico de baixo custo.** 2010. Dissertação (Mestre em Engenharia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Manaus, 2010.

FRADE, V. M. F. **Estudo do aumento de escala do processo enzimático de hidrólise da celulose obtida a partir de resíduos lignocelulósicos do bagaço de cana (*Saccharum officinarum* L.).** Laboratório de Química do Centro Universitário da FEI, 2011.

FURTADO, M. C. **Avaliação das oportunidades de comercialização de novas fontes de energias renováveis no Brasil.** 2010. 126 f. Dissertação (Mestre em Engenharia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GOLDEMBERG, J. Biomassa e energia. **Química Nova**, vol.32, n.3, pp. 582-587, 2009.

GUTMANIS, G. **Modulação do gene *ugp* e análise das alterações na composição dos carboidratos da parede celular primária e secundária de *Nicotiana tabacum* e *Eucalyptus grandis***. 2008. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2008.

HICKERT, L. R. **Otimização da Hidrólise da casca de arroz (*Oryza sativa*) e a avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras**. 2010. 117 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

LEMONS E SILVA, C. F.; SCHIRMER, M. A.; MAEDA, R. N.; BARCELOS, C. A.; PEREIRA JR., N. Potential of giant reed (*Arundo donax* L.) for second generation ethanol production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 10-15, 2015.

LUDWIG, V.S. **A agroindústria processadora de arroz: um estudo das principais características organizacionais e estratégias das empresas líderes gaúchas**. Dissertação (Mestrado em Agronegócio) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

MAEDA, R. N. **Produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa de bagaço de cana pré-tratado e sua aplicação na produção de etanol de segunda geração**. 2010. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MENDES, F. M. **Digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar tratado quimio-mecanicamente**. 2010, 101 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

NETO, O. B. **Integração das principais tecnologias de obtenção de etanol através do processamento de celulose (2ª geração) nas atuais usinas de processamento de cana-de-açúcar 1ª geração**. 2009. 137 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

NUNES, R. M.; GUARDA, E. A.; SERRA, J. C. V.; MARTINS, Á. A. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez. 2013.

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

OLIVEIRA, P.A. **Caracterizar a Biomassa é fundamental para valorizá-la**. 2013. Artigo em Hypertexto. Disponível em:<http://www.infobibos.com/Artigos/2013_1/biomassa/index.htm>. Acesso em: 6 maio 2015.

PAULA, J. N. **Biocombustíveis: uma realidade**. 2013. 70 f. Monografia (Formas Alternativas de Energia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. In **Series on Biotechnology**. Escola de Química - UFRJ, Rio de Janeiro, v. 2, p. 45, 2008.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar a bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 2007. 142 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PROMPT, A. H. **Análise da fermentação de glicose e xilose por leveduras *Spathaspora* isoladas de madeira em decomposição**. 2012. 85 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

RABELO, S. C.; **Avaliação e Otimização de Pré-tratamentos e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar para a Produção de Etanol de Segunda Geração**. Abril 2010. 454 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Processos Químicos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2010.

ROBERTO, I. C.; MUSSATO, S. I.; RODRIGUES, R. C. L. B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**.17, 171-176. 2003.

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

SANTOS, J. M. C. F. **Avaliação da biomassa de plantas bioenergéticas**. 2009. 79f. Dissertação (Mestrado Tecnologias Ambientais) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R.; MARTÍN, C. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010.

SCHWAB, N. T.; LORENZETT, D. B.; NEUHAUS, M.; BACKES, F. A. A. L. A Gestão de Resíduos e o Beneficiamento de Arroz. In: SIMPÓSIO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 14, 2010, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 2010.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. – 2010. xiii, 109 f.: il. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química. Rio de Janeiro, 2010.

SLUITER, A; HAMES, B.; RUIZ, R; SCARLATA, C.; SLUITER, J; TEMPLETON, D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. NREL, 14 p. 2005.

SOUSA, T. M. **Estudo da hidrólise enzimática no tratamento de biomassa lignocelulósica usada como matéria-prima para a produção de biocombustível**. 2014. 48 f. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2014

SOUZA, G. Q. **Caracterização química do Arundo donax para a obtenção de etanol 2G**. 2014. 43 f., il. Monografia (Bacharelado em Engenharia de Energia)— Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

STAVELA, T.; ARAÚJO, T.; PORTO, E. **GranBio inicia produção de etanol de segunda**. Disponível em: <http://www.granbio.com.br/wp-content/uploads/2014/09/partida_portugues.pdf>. Acesso em: 19 mar 2015.

VASCONCELOS, G. C.; GOMES, J. C. C.; CORRÊA, L. A. V. **Rendimento de Biomassa da Cana-do-Reino (Arundo donax L.)**. Embrapa Clima Temperado, 2006. 23 p. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 42). Pelotas, 2006.

VASQUEZ, M. P. **Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 205 p. Tese Doutorado (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2007.

WANDERLEY, M. C. A. **Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar em batelada alimentada para produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ufpeda 1238 em processos shf**. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Recife, 2012.

ZANETTI, G. D. **Lectina dos rizomas de *Arundo donax* L.: purificação, caracterização, propriedades, imuno-histoquímica e separação das isoformas**. 2007. 262f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.