

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE BACHAREL EM ENGENHARIA QUÍMICA

BEATRIZ CRISTINA BARBOSA CROSATTI

PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE
EMBALAGEM CARTONADA LONGA VIDA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2017

BEATRIZ CRISTINA BARBOSA CROSATTI

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE
EMBALAGEM CARTONADA LONGA VIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Química do Departamento de
Engenharia Química, da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Profa. Dra. Rosilene
Aparecida Prestes.

PONTA GROSSA

2017



TERMO DE APROVAÇÃO

PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE EMBALAGEM CARTONADA LONGA VIDA

por

Beatriz Cristina Barbosa Crosatti

Monografia apresentada no dia 02 de junho de 2017 ao Curso de Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. César Arthur Martins Chornobai
(UTFPR)

Profa. Dra. Elenise Sauer
(UTFPR)

Profa. Dra. Rosilene Aparecida Prestes
(UTFPR)
Orientadora

Profa. Dra. Juliana de Paula Martins
Responsável pelo TCC do Curso de Engenharia Química

AGRADECIMENTOS

Inicio esta página agradecendo à Ele, Senhor Meu Deus, por me dar coragem para continuar nesta caminhada e força para não desistir nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Edy e Valéria, pelo apoio e amor incondicionais demonstrados a cada segundo de minha vida. Ao meu irmão, Carlos Eduardo, por ser meu ponto de apoio e uma inspiração. Amo vocês com todo meu coração.

À Professora Rosilene, pela paciência e dedicação ao me orientar neste trabalho de conclusão, em todas as etapas.

À Professora Elenise, que me ajudou com as análises finais, minha gratidão pela atenção e disponibilidade.

Ao professor César Chornobai, sempre presente durante minha graduação, se mostrando além de ótimo professor um conselheiro e amigo. Agradeço pelo que fez e pelo que faz pela nossa UTFPR.

Aos demais professores, que exerceram papel fundamental no meu desenvolvimento acadêmico. Poucos têm a sorte de estudar em uma faculdade com a nossa. Sinto orgulho de me formar aqui e de ver o crescimento e reconhecimento da universidade dia após dia.

Às amigadas de longa data, por estarem sempre presentes mesmo distantes fisicamente. E claro, às amigadas que construí durante este período, em especial aos amigos da turma 2012/2, vocês são família! E juntos, como sempre, nós conseguimos!

Por fim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma para meu crescimento pessoal e profissional.

Muito obrigada!

RESUMO

CROSATTI, Beatriz Cristina Barbosa. **Produção de Etanol de Segunda Geração a partir de Embalagem Cartonada Longa Vida**. 2017. 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso Bacharelado em Engenharia Química – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2017.

A demanda por novas matérias-primas e processos para obtenção de combustíveis só tem crescido ao ritmo que a sociedade se desenvolve. Tanto na zona rural como na zona urbana, o uso de máquinas, carros, caminhões que utilizam os mais variados combustíveis para desenvolvimento de suas atividades vem sendo amplamente empregados. O etanol de segunda geração, produzido a partir de resíduos vegetais antes não utilizados, exemplifica claramente essa necessidade, e novas fontes estão sendo testadas e descobertas para a obtenção do produto. Em busca de alternativas para produção, idealizou-se a utilização do papel cartão contido em embalagens cartonadas longa vida como substrato, a partir da hidrólise enzimática da celulose presente e posterior fermentação. Além da obtenção do etanol, trata-se da possibilidade de reutilização de um resíduo gerado continuamente e em grandes quantidades. A partir de experimentos em escala laboratorial utilizando-se dois complexos enzimáticos distintos – Cellic HTec2 e Cellic CTec2 - pode-se determinar boas condições para o progresso da ideia, obtendo o produto desejado em quantidades satisfatórias e em curto período de tempo. O etanol foi quantificado a partir de análises por cromatografia gasosa. A preparação Cellic CTec2 ofereceu resultados mais regulares dentre todos, principalmente quando o volume enzimático foi de 600 mL, produzindo 0,218 g de etanol a partir da hidrólise e fermentação de 2 g de papel cartão. O entrave para a evolução em larga escala se deve ao ainda alto custo das enzimas ou complexos enzimáticos utilizados para degradação da celulose. É um segmento interessante, o qual necessita de estudos posteriores para se dar continuidade e refinar o processo de obtenção do produto final.

Palavras-chave: Etanol de Segunda Geração. Papel Cartão. Enzima. Hidrólise. Fermentação.

ABSTRACT

CROSATTI, Beatriz Cristina Barbosa. **Production of Second-Generation Ethanol From Long Life Carton Package.** 2017. 2017. 55 f. Work of Conclusion Course (Graduation in Chemical Engineering) - Federal Technology University - Paraná. Ponta Grossa, 2017.

The requirement for new sources and processes to obtain fuels has grown as the society develops. Both in the agricultural and urban zones, the usage of machines, cars and trucks that requires fuel to execute their activities is a growing reality. The second-generation ethanol, produced by vegetable residues, exemplifies the necessity for fuel where new sources have been tested and discovered to obtain the product. Trying to find alternatives for ethanol production, the usage of cardboard inside the “long life carton package” as substrate was idealized. The process was based in the enzymatic hydrolysis and fermentation of the cellulose contained inside the carton package. Besides the successful obtainment of the ethanol, this process lights up the possibility of reusing large scale generation of residues. In laboratorial scale, two distinct enzymatic complexes were used – Cellic HTec2 and Cellic CTec2 – this complexes determined good conditions for the progress of the idea. Ethanol was obtained in satisfactory quantities in a short period of time. The ethanol was quantified by gas chromatography analysis. The complex Cellic CTec2 offered more prevailing results among others, mainly when the enzyme volume was 600 μL , producing 0,218 g of ethanol from the hydrolysis and fermentation of 2 g of cardboard. The hindrance for the evolution in large scale is set by the high cost of the enzymes or enzymatic complexes used for cellulose degradation. It's an interesting segment, which needs further studies to give continuity and refine the process of obtaining ethanol from cardboard.

Keywords: Second-Generation Ethanol. Cardboard. Enzyme. Hydrolysis. Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Oferta Interna de Energia no Brasil - 2015 (%)	14
Figura 2 - Aplicações do Etanol.....	17
Figura 3 - Estrutura Molecular da Celulose	24
Figura 4 - Ação das Celulases sobre a Molécula de Celulose	28
Figura 5 - Disposição das Camadas Componentes da Embalagem Cartonada Longa Vida	31
Figura 6 - Papel Cartão Triturado e Seco.....	34
Figura 7 – Complexos Enzimáticos: (a) Cellic HTec2 (NS-22244) e (b) Cellic CTec2	35
Figura 8 - Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
Figura 9 – Incubadora <i>Shaker</i> Utilizada para Agitação das Amostras	39
Figura 10 - Centrífuga Utilizada no Preparo das Amostras	40
Figura 11 - Cromatógrafo a Gás.....	41
Figura 12 - Amostra para Análise por Cromatografia Gasosa.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Venda de Veículo Leves <i>Flex-Fuel</i> e a Etanol.....	16
Gráfico 2 - Curva de Calibração Obtida Após Análises de Amostras com Concentrações Variadas do Padrão Externo de Etanol	45
Gráfico 3 - Cromatograma Referente à Análise da Amostra 9 Tratada com Complexo Enzimático Cellic HTec2	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Processos para Pré-Tratamento da Biomassa para Hidrólise.....	26
Tabela 2 - Planejamento Fatorial para Produção de Etanol em Escala Laboratorial.	37
Tabela 3 - Composição das Amostras com Cellic HTec2	38
Tabela 4 - Composição das Amostras com Cellic CTec2	38
Tabela 5 - Volumes Utilizados para Construção da Curva de Calibração.....	44
Tabela 6 - Resultados das Análises das Amostras com Solução Padrão de Etanol para Construção da Curva de Calibração	45
Tabela 7 - Áreas Obtidas após as Leituras das Amostras Tratadas com o Complexo Cellic HTec2.....	48
Tabela 8 - Quantificação do Etanol nas Amostras após Tratamento com a Preparação Enzimática Cellic HTec2	48
Tabela 9 - Quantidade de Etanol a Ser Produzida por Tonelada de Papel Cartão Tratado com Complexo Enzimático Cellic HTec2	49
Tabela 10 - Áreas Obtidas após as Leituras das Amostras Tratadas com o Complexo Cellic CTec2.....	51
Tabela 11 - Quantificação do Etanol nas Amostras após Tratamento com a Preparação Enzimática Cellic CTec2	51
Tabela 12 - Quantidade de Etanol a Ser Produzida por Tonelada de Papel Cartão Tratado com Complexo Enzimático Cellic CTec2	52

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
mL	Mililitros
µL	Microlitros
g	Gramas(s)

LISTA DE SIGLAS

CG	Cromatografia Gasosa
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
CNI	Confederação Nacional da Indústria
GEE	Gases do Efeito Estufa
BNDES	Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social
CGEE	Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
GP	Grau de Polimerização
FS	Fermentação Submersa
FMSS	Fermentação em Meio Semi-Sólido
FES	Fermentação em Estado Sólido
SHF	Hidrólise e Fermentação em Separado
SSF	Sacarificação e Fermentação Simultâneas
SSCF	Sacarificação com Co-Fermentação Simultâneas
BEN	Balanco Energético Nacional
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
pH	Potencial Hidrogeniônico
DP	Desvio Padrão
CV	Coefficiente de Variação

LISTA DE ACRÔNIMOS

Proálcool	Programa Nacional do Alcool
E2G	Etanol Segunda Geração
CBP	Bioprocesso Consolidado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVOS	13
1.1.1 OBJETIVO GERAL	13
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 A ERA DA BIOENERGIA E DOS BIOCOMBUSTÍVEIS	14
2.2 O ETANOL NO CENÁRIO ATUAL	15
2.3 O ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO	18
2.4 O ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO	21
2.5 A LIGNOCELULOSE	23
2.6 PROCESSO DE OBTENÇÃO DO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO	24
2.7 A EMBALAGEM CARTONADA LONGA VIDA	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 MATERIAL	33
4.2 MÉTODOS	33
4.2.1 Extração da Matéria-Prima	33
4.2.2 Degradação da Celulose	34
4.2.3 Fermentação da Glucose	35
4.2.4 Preparação das Amostras	36
4.2.5 Produção De Etanol de Segunda Geração Por Enzimas Industriais	39
4.2.6 Quantificação Do Etanol por CG	40
4.2.7 Modelamento Empírico	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 TRATAMENTO COM COMPLEXO ENZIMÁTICO CELLIC HTEC2	47
5.2 TRATAMENTO COM COMPLEXO ENZIMÁTICO CELLIC CTEC2	51
5.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	54
5.4 CUSTO	56
5.5 CONTRIBUIÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	57
6 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

O contínuo desenvolvimento e crescimento da sociedade moderna é um fato concreto. As cidades estão cada vez maiores, a população segue aumentando, os setores industrial e tecnológico em expansão, dentre outras evidências que compõem esse cenário. Acompanhando essa realidade, a necessidade do uso de combustíveis tem se tornado cada dia maior, uma vez que são intensamente utilizados para a manutenção do fluxo, principalmente, da vida urbana no mundo como um todo.

Combustíveis são responsáveis por manter carros circulando e máquinas funcionando, atendendo sempre à demanda da população. No entanto, como é de conhecimento, existem combustíveis não renováveis, como os combustíveis fósseis, derivados do petróleo, e os renováveis (ou biocombustíveis), como o etanol e o biodiesel, que vem sendo cada vez mais empregados devido a essa capacidade de serem sempre produzidos, não havendo grande preocupação com um possível esgotamento de sua fonte, como é o caso dos derivados do petróleo. Porém, apesar de pertencer a essa categoria, o uso em específico do etanol como combustível não deixa de causar impactos ambientais significativos ao meio ambiente. A cana-de-açúcar, principal fonte de matéria-prima para a produção de etanol – conhecido como etanol de primeira geração - exige uma grande área para seu plantio, o que pode provocar um progressivo desmatamento de certas regiões de mata natural e o consequente esgotamento do solo. Além disso, durante o beneficiamento, apenas o caldo é aproveitado para a transformação em etanol, desperdiçando-se grande parte da biomassa residual.

Portanto, a ideia de aumentar a produção atual de etanol, evitando principalmente o aumento do plantio de canaviais, ganha enfoque de estudo, buscando-se alternativas para a obtenção deste produto. Da necessidade de se obterem novas fontes de matéria prima para a produção do álcool biocombustível, surgiu o conceito de etanol de segunda geração: a produção do combustível utilizando-se de biomassa, ou seja, de fontes antes não aproveitadas para este fim devido à presença da lignocelulose, material composto basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, as quais conferem estrutura e rigidez ao vegetal. No entanto,

para o aproveitamento dessas matérias-primas, é necessário um pré-tratamento da biomassa, a fim de desestruturar a configuração lignocelulósica, expondo a celulose contida e viabilizando sua conversão em açúcares passíveis de fermentação por meio da hidrólise – química ou enzimática - dessas macromoléculas. A fonte de obtenção do etanol celulósico mais usualmente desenvolvida advém do bagaço e do palhiço da cana-de-açúcar, mas outros resíduos de origem celulósica podem ser utilizados, assim como a embalagem cartonada, material analisado neste trabalho.

A embalagem cartonada longa vida é composta basicamente pela união ordenada de camadas de polietileno, alumínio e papel-cartão. Para fins de produção de bioetanol, somente a camada de papel-cartão será submetida ao processo de hidrólise, já que é a única composta apenas por celulose.

Um efeito positivo do uso da embalagem cartonada como material para a produção do etanol de segunda geração é o de que esta alternativa se tornaria um destino para este tipo de resíduo, complementando as variadas técnicas de reutilização já existentes, que vão desde a reciclagem industrial do material até o uso em artesanato. Ademais, o processo para obtenção do biocombustível a partir desse material é mais simples quando comparado ao do bagaço da cana-de-açúcar, uma vez que a etapa do pré-tratamento não é necessária, pois o papel-cartão é composto somente por camadas de celulose.

De maneira geral, a busca por tecnologias e por matérias-primas que possam ser submetidas ao mesmo processo é contínua, como no caso deste trabalho. Foram realizados testes com enzimas, em escala laboratorial, acerca da hidrólise do material celulósico componente da embalagem e da fermentação simultânea do degradado utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, analisando aqueles cuja eficiência seja maior e garantindo, portanto, a produção de um biocombustível de qualidade e em conformidade com os padrões estabelecidos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Produzir etanol de segunda geração utilizando-se de fontes alternativas ao bagaço de cana-de-açúcar.

1.1.2 Objetivos Específicos

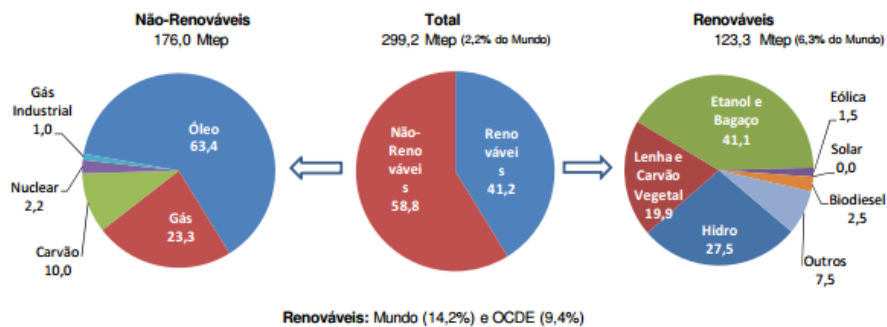
- Otimizar protocolo para produção do etanol por centrifugação, após adição de enzimas industriais a partir da polpa de celulose;
- Avaliar o processo e o produto isolado e comparativamente levando em conta o balanço de massa para o processo por enzimas industriais por planejamento fatorial;
- Otimizar e validar método para determinação do produto por técnicas cromatográficas (CG);
- Caracterizar o perfil de pureza do álcool obtido para determinar o uso final do produto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A ERA DA BIOENERGIA E DOS BIOCOMBUSTÍVEIS

Nota-se que a matriz energética brasileira é bastante limpa quando comparada com a média mundial. É fortemente representada pelo uso dos biocombustíveis, como etanol e biodiesel, pela produção de energia a partir de hidroelétricas, pelo uso de biomassa como fonte energética, dentre outras formas. De acordo com a Confederação Nacional da Indústria (CNI, 2008, p. 9), “46% da energia no Brasil é produzida por fontes renováveis, percentual quatro vezes maior que a média mundial”. Dessa forma, a emissão de gases do efeito estufa (GEE) emitidas pelo Brasil como um todo são menores quando comparados aos valores mundiais, as quais são produzidas principalmente pelo uso de combustíveis fósseis como o petróleo e seus derivados. Devido à necessidade constante de energia no panorama brasileiro, CNI (2008, p. 17) afirma que “o ritmo de crescimento da oferta de energia elétrica no Brasil foi de 6,1% ao ano nos últimos 35 anos” e também que “nesse mesmo período, a taxa de expansão da oferta de energia elétrica no mundo foi bastante inferior: média de 3,4% ao ano”. Porém, apesar desse crescimento vertiginoso, o país continua com a característica limpa, sempre preocupado com a questão do desenvolvimento sustentável de sua matriz energética (CNI, 2008). Na figura 1, tem-se uma representação da estrutura da matriz energética no Brasil, em 2015.

Figura 1 - Oferta Interna de Energia no Brasil - 2015 (%)



Fonte: MME (2015)

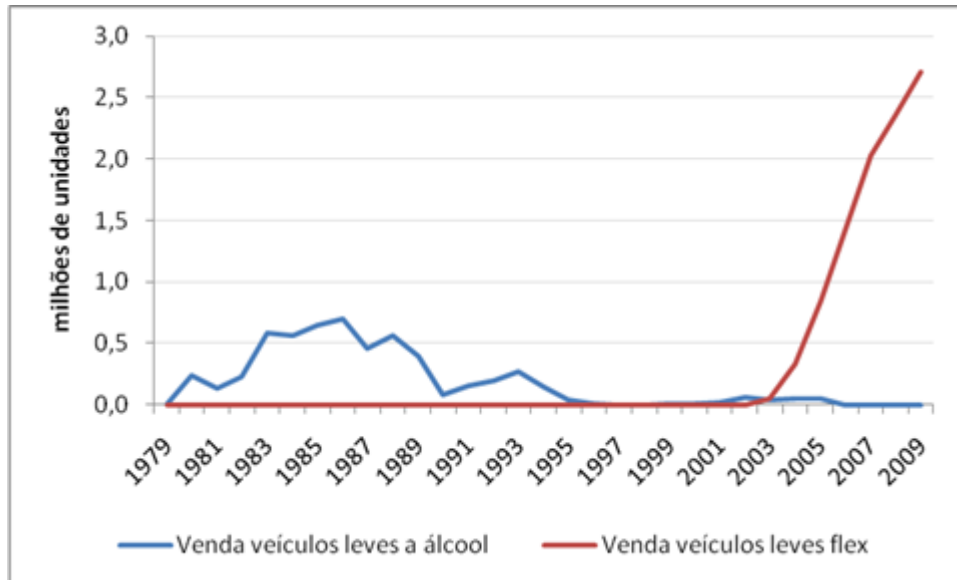
A energia, em todas as suas formas, é indispensável à articulação e ao desenvolvimento da sociedade. Dessa forma, a busca por novas alternativas, principalmente por aquelas que diminuam os impactos ambientais durante seu processo de obtenção, é incessante. Fontes de energia renováveis, como os biocombustíveis, são cada vez mais empregadas no cotidiano urbano, seja no abastecimento veicular, nas indústrias de bebidas, farmacêutica, química, dentre outras aplicações. Daí a necessidade de incrementar as atuais formas de produção, seja pela descoberta de novas matérias-primas, de novas rotas de produção, pela otimização dos processos já existentes ou com o auxílio de novas técnicas e tecnologia, colaborando para o sucesso desse setor que só tende a crescer.

2.2 O ETANOL NO CENÁRIO ATUAL

Segundo Rosa e Garcia (2009, p. 120), “a produção de biocombustíveis foi insignificante até o fim da década de 1970”, período no qual o uso de combustíveis derivados do petróleo era mais intenso no Brasil. No entanto, a partir da implantação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) pelo governo brasileiro, esse cenário foi alterado, com uma maior participação do etanol do mercado, associado à inclusão do biocombustível à gasolina e ao desenvolvimento de carros abastecidos exclusivamente por ele. Ademais, a partir de 2003 houve a substituição do aditivo éter metil-tercbutílico pelo etanol na composição da gasolina, por meio de uma legislação vigente em alguns estados norte-americanos. Também ocorreu a consolidação dos veículos *flex*, adaptados ao biocombustível para que, como afirmam o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social e o Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (BNDES e CGEE, 2009, p. 42), “tenham desempenho, dirigibilidade, condições de partida a frio e durabilidade absolutamente similares aos motores a gasolina, especialmente em países com invernos moderados”. Dados expostos por Swarzac (2013) mostram que, em 2012, as vendas de automóveis leves do tipo *flex* atingiram 87% no mercado brasileiro. Se somados aos automóveis movidos a diesel, os valores ultrapassam os 90%. (ROSA; GARCIA,

2009; BNDES e CGEE, 2009; SWARZAC, 2013). A figura 2 representa o aumento das vendas de veículos *flex* a partir de 2003.

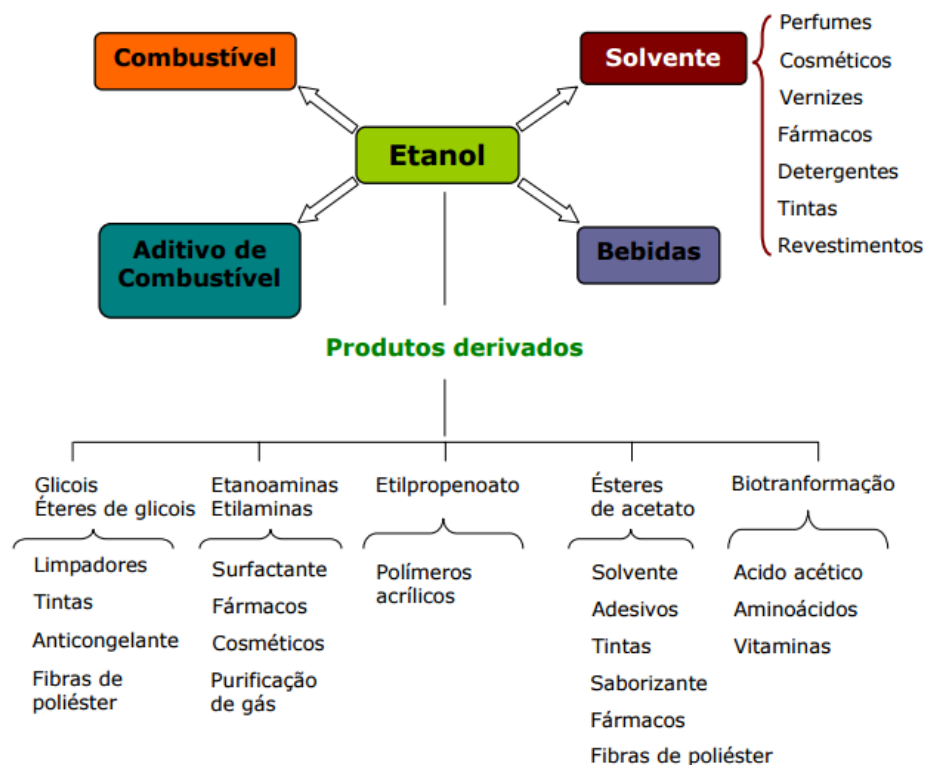
Gráfico 1 - Venda de Veículo Leves *Flex-Fuel* e a Etanol



Fonte: Blog Infopetro (2010)

Na atual conjuntura brasileira, a produção do etanol merece destaque e ganha cada vez mais forças para seu desenvolvimento. Como exemplificado na figura 2, o etanol está presente em vários setores industriais. O Brasil é um país que possui alta demanda por esse biocombustível, e dessa forma tem procurado seu incremento, seja pela melhoria do processo comumente utilizado, a partir da fermentação do caldo de cana-de-açúcar, seja pelo desenvolvimento de novas técnicas e matérias-primas diferenciadas, como no caso do etanol celulósico, obtido a partir de materiais lignocelulósicos, que serão melhor explicitados posteriormente neste trabalho.

Figura 2 - Aplicações do Etanol



Fonte: Vásquez (2007)

Além do uso contínuo do etanol no cotidiano do consumidor, outra principal questão que impulsiona seu desenvolvimento e que está atrelada ao uso dos biocombustíveis em detrimento ao uso de combustíveis fósseis é a da diminuição dos impactos ambientais no que diz respeito à emissão de Gases do Efeito Estufa (GEE) na atmosfera. Os combustíveis fósseis emitem grandes quantidades de poluentes, atividade intrinsecamente associada ao aquecimento global e às suas consequências, como o aumento da temperatura do planeta, o derretimento de geleiras, as catástrofes ambientais cada vez mais agressivas, dentre outras complicações. Daí a necessidade de fontes alternativas, que colaborem com a diminuição dessas emissões (CGEE, 2009). De acordo com BNDES e CGEE (2008, p. 49) “como consequência de sua composição, comparativamente às gasolinas típicas, a combustão à gasolina com etanol e do etanol puro em motores produz menores emissões de monóxido de carbono (CO), óxidos de enxofre (SO_x), hidrocarbonetos e outros compostos poluentes”.

Ademais, é fato que as fontes não renováveis de energia, como o próprio nome sugere, não serão eternas, havendo a necessidade de sua substituição por outras que exerçam o papel de maneira eficiente.

A produção do etanol apresenta inúmeras vantagens para instalação e desenvolvimento no Brasil. O país possui uma grande disponibilidade de área cultivável, o que gera uma grande produtividade tanto de cana-de-açúcar quanto de biomassa, fontes de matéria-prima para o etanol de primeira e segunda geração, respectivamente (CGEE, 2009). Além disso, possui um balanço energético muito positivo. Segundo CGEE (2009, p. 29), em relação à biomassa da cana-de-açúcar, esta “é atualmente a opção de biomassa energética de maior produtividade por unidade de área e de melhor balanço energético, que é a razão entre a energia que sai na forma de produto (etanol e energia mecânica, térmica e elétrica) e a energia fóssil consumida na cadeia produtiva”.

Além dessas vantagens na produção do etanol de forma geral, a ideia do etanol celulósico tem sido bastante difundida, devido a fatores que serão mais bem exemplificados posteriormente, na seção 3.4.

De maneira geral, essa é, definitivamente, a era dos biocombustíveis, momento no qual tecnologias são desenvolvidas e novas matérias-primas são testadas a fim de otimizar a produção destes, incrementar o volume final de produto e, no mais, diminuir os efeitos negativos sobre o meio ambiente. O uso de fontes não renováveis, como o petróleo e seus derivados, ainda representa grande parcela dessas formas de energia primárias. Contudo, tem-se a noção de que, em longo prazo, essas não serão mais opções de obtenção de energia. Assim, as formas renováveis ganharão cada vez mais espaço, aliadas a um profundo desenvolvimento de técnicas e formas de obtenção e da biotecnologia empregadas.

2.3 O ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO

Para Arias et al. (1999 apud CARVALHO et al., 2013, p. 533), etanol, comumente conhecido por álcool, é o mesmo que a substância química álcool

etílico, de fórmula molecular C_2H_5OH . Trata-se de um líquido incolor, volátil, de cheiro similar ao do éter e miscível em água e em outros líquidos orgânicos. Pode ser comercializado na forma hidratada, em composição de 95 a 96%, e na forma anidra, com composição maior que 99% em volume. A obtenção ocorre por meio da fermentação de vegetais com abundância de açúcar em suas composições, como a beterraba, o milho, a mandioca, o arroz, frutas e matérias celulósicas. No contexto brasileiro, a matéria-prima trivialmente utilizada é a cana-de-açúcar.

O termo “etanol de primeira geração” refere-se à produção do biocombustível a partir da fermentação das moléculas de sacarose presentes na cana-de-açúcar. Consiste basicamente na adição de microrganismos como bactérias e fungos ao caldo da cana, capazes de degradar estas moléculas presentes na sua composição e transformá-las em etanol, com a liberação de gás carbônico. O processo é dividido em etapas. Na etapa de lavagem, a cana de açúcar *in natura* recém-chegada à usina é conduzida por meio de uma esteira rolante, na qual é lavada para a retirada de poeira, areia, terra e outras impurezas presentes. Após isso, a cana é picada e um eletroímã é utilizado com a finalidade de retirar os materiais metálicos ali contidos. Na sequência, é efetuada a moagem da cana por rolos trituradores. Nesse processo, um líquido chamado melado é produzido, correspondendo a 70% do produto original. Os 30% restantes constituem a parte sólida, que dará origem ao bagaço. O melado é o produto que dá sequência ao processo de produção do biocombustível, enquanto o bagaço pode ser reutilizado como aproveitamento energético para a própria usina. O melado ainda contém partículas residuais (restos do bagaço, areia, dentre outros) em sua composição. A fim de eliminá-las, o líquido passa através de uma peneira e segue para um tanque para descanso, com o objetivo de decantar as impurezas restantes. Em seguida, o melado está puro e tem o nome de caldo clarificado, que passará pela última etapa de retirada de impurezas, chamada de esterilização. O caldo clarificado é aquecido, eliminando os microrganismos ali existentes. Depois desta etapa, ele encontra-se completamente puro e é levado à doma, onde é misturado a um fermento contendo leveduras – a mais trivial é a *Saccharomyces cerevisiae*. Tais microrganismos vão degradar moléculas de glicose presentes no açúcar do caldo, levando à produção de etanol e gás carbônico, processo comumente conhecido como fermentação, que tem duração de várias horas e possui como produto final o vinho, ou vinho fermentado,

constituído das leveduras, açúcares que não foram fermentados e cerca de 10% de etanol. Como o etanol está misturado com outros componentes no vinho fermentado, é necessária sua separação da mistura. O vinho é colocado em colunas de destilação, onde é aquecido até a evaporação. Em seguida, ocorre a condensação do vapor, processo no qual o etanol é separado. Assim, tem-se o álcool hidratado, que é utilizado como combustível, com cerca de 96% de teor alcoólico (NOVA CANA, 2016).

Segundo Viegas (2010), em termos de custos de produção, a cana-de-açúcar oferece melhores resultados quando comparados à produção a base de milho, comum nos Estados Unidos. De maneira geral, os custos com a matéria-prima e com a produção em si são aliados no cenário brasileiro, além de haver um grande mercado consumidor, tanto interno quanto externo. A cana-de-açúcar gera resíduos que são amplamente utilizados no setor industrial. O milho e seus subprodutos, em contrapartida, são mais bem aproveitados no setor alimentício quando comparados ao setor alcooleiro, fazendo com que a produção deste fique em detrimento. Dados revelam que, em 2006, o custo do etanol brasileiro girava em torno de US\$ 0,25/litro e US\$ 0,35/litro, valor mais baixo que o do biocombustível produzido pelos Estados Unidos por meio do milho no mesmo ano, o qual variava entre US\$ 0,40/litro e US\$ 0,60/litro. No entanto, em termos de liderança de mercado mundial, outros fatores como câmbio e valorização da moeda, incentivos aos produtores americanos e tarifário para exportações acabam por acirrar a competitividade entre as duas formas de produção.

Macedo (2007, p. 101) afirma em seu trabalho que “os produtos energéticos da cana, etanol e bagaço têm contribuído largamente para redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE) no Brasil, por meio da substituição de combustíveis fósseis, ou seja, gasolina e óleo combustível”. Conclui-se também que a emissão dos GEE é significativamente evitada quando a gasolina é substituída pelo etanol e quando o óleo combustível utilizado para geração de energia é permutado pelo bagaço da cana. Além disso, a relação entre a energia renovável obtida e a energia fóssil utilizada no processo está entre 8,2 e 10,5, ou seja, um coeficiente muito positivo, comparando com o etanol produzido a partir do milho, onde a relação está entre 1,0 e 1,4. (MACEDO, 2007; LEITE; CORTEZ, 2008).

Inúmeros fatores colocam o Brasil em posição de destaque no contexto da produção de etanol, principalmente pelo fato da boa desenvoltura da agricultura no que diz respeito à adaptação da cana-de-açúcar ao solo brasileiro. A tecnologia para a produção do biocombustível sempre em desenvolvimento e as várias matérias-primas disponíveis também acrescentam, além do vasto mercado no qual o etanol está incluído, que é suprido sem a necessidade de se ampliar a área plantada e também sem reduzir as já destinadas ao setor alimentício (PACHECO, 2011). Unica (2011) ressalta que menos de 1% em área plantada do território nacional é destinada ao setor sucroalcooleiro. Previsões para o ano de 2017 relatam que, mesmo com um crescimento na produção, a área cultivada não ultrapassará os 1,7% do território. No entanto, a esta atividade estão relacionados inúmeros aspectos ambientais, como a degradação pelo uso intensivo do solo, possível desmatamento de áreas para plantio, a poluição do ar pelas queimadas, que apesar de proibidas por lei, ainda são executadas em algumas regiões, dentre outros.

2.4 O ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Cada vez mais novas tecnologias têm sido estudadas com a finalidade de incrementar a produção atual de etanol e suprir a constante necessidade do uso de combustíveis pela sociedade moderna. De acordo com Bezerra (2007), buscando evitar o aumento da área plantada de cana-de-açúcar, uma possível competição entre o uso da terra para fins alimentícios e para a produção do biocombustível e, por consequência, o desmatamento, pesquisas tem sido feitas e preveem um futuro promissor no Brasil no que diz respeito à obtenção do bioetanol. Daí surgiu o conceito de etanol de segunda geração, também conhecido com E2G, bioetanol ou etanol celulósico. Segundo Pacheco (2011, p. 3), “essa nova geração representa uma alternativa para o uso energético da biomassa, apresentando vantagens ambientais e econômicas, por ser o etanol produzido a partir de lignocelulose, presente em resíduos de origem vegetal”.

De forma geral, os processos atualmente existentes para a obtenção do bioetanol a partir de biomassas sacaríneas e amiláceas não possuem ganhos energéticos e ambientais muito relevantes. Ademais, algumas dessas matérias-primas possuem outros mercados aos quais estão mais adaptadas, como o de alimentos ou de insumos com finalidades diversas, e o fato de que a cana-de-açúcar não é um vegetal que se adapta a todos os locais do planeta faz com que novas rotas de produção e fontes sejam necessárias a fim de suprir as necessidades das mais variadas sociedades, levando sempre em conta os aspectos econômicos e ambientais (BNDES, 2008).

No Brasil, as primeiras pesquisas sobre a segunda geração de etanol partiram dos resíduos da produção por meio da cana-de-açúcar e do milho. O bagaço é usualmente empregado para geração de energia elétrica e no abastecimento das caldeiras, suprindo as necessidades internas da indústria (NOVA CANA, 2016). No entanto, o grande volume de biomassa produzido, aliado aos estudos desenvolvidos a fim de minimizar o gasto de energia e otimizar os processos resultam em um excedente de uma matéria-prima capaz de incrementar o volume final de biocombustível, além de evitar o aumento da área plantada de cana (CNPEM, 2014).

Ademais, a principal função do E2G é incrementar a produção atual, utilizando as mais variadas formas de biomassa, como o bagaço e a palha da cana, gramíneas, cascas, dentre outros resíduos geralmente descartados no processo produtivo. O E2G já é uma realidade, porém é necessário a detenção de tecnologias mais complexas, que ainda não estão em pleno desenvolvimento quando comparado às outras técnicas vigentes de produção de etanol (BARROS, 2016).

Apesar do enfoque dado, no Brasil, aos produtos residuais da cana-de-açúcar como principais fontes de matéria prima para produção do etanol de segunda geração, existem outros materiais com o mesmo potencial, uma vez que também pertencem à categoria de materiais celulósicos em termos de composição, como é o caso da embalagem do tipo cartonada, alvo deste trabalho.

2.5 A LIGNOCELULOSE

Segundo a definição de Pacheco (2011, p. 4):

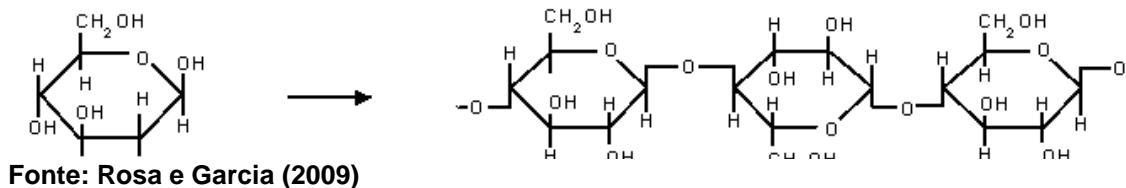
“O material lignocelulósico é constituído de três tipos de polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, que se encontram em associação por pontes de hidrogênio ou ligação covalentes. A celulose é formada por subunidades de D-glicose, unidas por ligação glicosídica. A hemicelulose é uma estrutura bem mais complexa por ser constituída por diferentes tipos de pentoses, hexoses e açúcares ácidos unidos entre si. A lignina é associada à parede vegetal, conferindo à planta resistência a ataques microbiológicos e mecânicos, além de rigidez e impermeabilidade.”

A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n é uma macromolécula composta pela associação de inúmeros monômeros (figura 3), tendo estes a glicose como molécula principal (ROSA e GARCIA, 2009;). Este polímero não é de fácil degradação devido à forma de associação entre suas moléculas que, quando associadas, formam microfibrilas cristalinas devido às ligações de pontes de hidrogênio entre as cadeias de monômeros. Assim, há a formação de uma estrutura ordenada no interior das células do vegetal (FERRAZ, 2004 apud. FERREIRA, 2014). Além dessas estruturas ordenadas, existem regiões onde a ordenação é menor ou inexistente, nas quais alguns autores sugerem que a hidrólise ocorre de maneira mais fácil, devido a uma maior área de contato enzima- molécula (PITARELO, 2007).

Segundo Rosa (2014, p. 17), o índice de cristalinidade (IC) e o grau de polimerização (GP) são propriedades importantes, uma vez que “auxiliam na diferenciação e classificação dos polímeros”. Além disso, também afirma que

“o GP (que se trata do número de unidades de glicose anidra presente em cada fibra) informa a frequência relativa de ligações glicosídicas internas e terminais, disponíveis para atuação de endo e exoenzimas, respectivamente. Ele pode ser definido com base no número médio de monômeros e no peso médio do polímero, assim como pode também ser inferido a partir de sua viscosidade. Já o IC está associado à reatividade do substrato, e pode ser quantificado pela técnica de difração de raios-X, utilizando-se equações intrínsecas ao tipo de celulose avaliado.”

Figura 3 - Estrutura Molecular da Celulose



A hemicelulose e a lignina também são polissacarídeos grandes, compostos por unidades menores de vários tipos de açúcares, porém em geral são de uma complexidade maior quando comparadas à celulose.

2.6 PROCESSO DE OBTENÇÃO DO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Tecnologias têm sido desenvolvidas para a produção do E2G desde o fim do século XIX. No entanto, apenas recentemente a ideia de incrementar o mercado de combustíveis com este tipo de biocombustível foi adotada, a qual tem sido amplamente estudada e desenvolvida com mais afinco pelos laboratórios e indústrias. As principais pesquisas foram iniciadas nos Estados Unidos e na Europa e por se tratar de uma produção que pode ser aplicada em quase todos os locais do planeta – uma vez que a geração de biomassa é constante e em níveis elevados em todas as regiões - seu aprimoramento é de interesse de vários países que não possuem disponibilidade para grandes plantações de cana ou de milho, por exemplo (BNDES e CGEE, 2008).

A produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa lignocelulósica envolve um número maior de etapas quando comparada à produção do etanol de primeira geração. O caldo da cana-de-açúcar é fermentado, obtendo de forma direta o biocombustível. No caso do E2G, são necessários a análise da biomassa, levantando parâmetros como porosidade, composição, idade do vegetal, tamanho do particulado, e também um tratamento adequado desta para que a fermentação possa ser feita. As principais etapas desse processo são o pré-

tratamento, seguido da hidrólise da celulose contida e, por fim, a fermentação seguida da destilação, seguindo o que já é usualmente feito para a produção do etanol convencional (BNDES e CGEE, 2008).

O pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos tem como principal objetivo melhorar o acesso à celulose contida na biomassa, a qual será posteriormente reduzida a moléculas menores (glicose) e fermentada. A lignina que envolve a celulose impede a hidrólise, sendo necessária a quebra desta estrutura celular envoltória para permitir o que tanto as moléculas de celulose quanto as de hemicelulose sejam hidrolisadas. Existem vários tipos de pré-tratamento, os quais possuem ações específicas acerca da composição do material a ser tratado (lignina, hemicelulose e celulose) (ALVIRA et al., 2010 apud. NUNES et al., 2013; OGEDA; PETRI, 2010 apud. NUNES et al, 2013; ROSA; GARCIA, 2009).

De acordo com a definição de BNDES e CGEE (2008, p. 126), o pré-tratamento:

“visa à limpeza e à “quebra” do material, a fim de causar a destruição da sua estrutura celular e torná-la mais acessível aos tratamentos químicos ou biológicos posteriores. A etapa seguinte consiste na remoção da lignina e na hidrólise da hemicelulose, que também pode ser denominada pré-tratamento. Para essa etapa, existem diversos tipos de processos, com diferentes rendimentos e efeitos distintos sobre a biomassa e consequente impacto nas etapas subsequentes.”

Para Rosa e Garcia (2008) a lignina do pré-tratamento, por ser um material de difícil degradação química, é geralmente utilizada para geração de energia térmica. Já a celulose e a hemicelulose presentes seguem para a etapa de hidrólise, onde serão quebradas em moléculas menores de açúcares fermentescíveis. Como processos de pré-tratamento que preparam a biomassa para a hidrólise, pode-se citar os especificados na tabela 1.

Tabela 1 - Processos para Pré-Tratamento da Biomassa para Hidrólise

Processo	Descrição	Tempo de reação	Rendimento de xilose	Custo*
Físicos				
Explosão de vapor	A biomassa triturada é tratada com vapor (saturado, 160°-260° C) seguido de uma rápida descompressão	1-10 min	45%-65%	
Termoidrólise	Utiliza água quente a alta pressão (pressões acima do ponto de saturação) para hidrolisar a hemicelulose	30 min	88%-98%	
Químicos				
Hidrólise ácida	Por meio do uso de ácidos sulfúrico, clorídrico, ou nítrico, concentraos ou diluídos	2-10 min	75%-90%	+
Hidrólise alcalina	Pelo uso de bases, como hisróxidos de sódio ou cálcio	2 min	60%-75%	++
Organosolv	Uma mistura de um solvente orgânico (metanol, bioetanol e acetona, por exemplo) com um catalisador ácido (H ₂ SO ₄ , HCl) é usada para quebrar as ligações internas da lignina e da hemicelulose	40-60 min	70%-80%	
Biológicos	Utilização de fungos para solubilizar a lignina. Geralmente, é utilizado em combinação com outros processos			
Combinados				
Explosão de vapor catalisada	Adição de H ₂ SO ₄ (ou SO ₄) ou CO ₂ na explosão de vapor pode aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, diminuir a produção de compostos inibidores e promover uma remoção mais completa da hemicelulose	1-4 min	88%	
Afex (<i>ammonia fiber explosion</i>)	Exposição à amônia líquida a alta temperatura e pressão por um certo período de tempo, seguida de uma rápida descompressão		50%-90%	
Explosão de CO ₂	Similar à explosão de vapor			

Fonte: Adaptado de BNDES e CGEE (2008)

Para o presente trabalho, os métodos de pré-tratamento não receberam muito enfoque e foram descartados durante a metodologia, uma vez que a embalagem cartonada é composta apenas por camadas celulose. Dessa forma, não

há a necessidade de submeter a matéria-prima em questão a esse processo, já que as composições de hemicelulose e lignina foram previamente retiradas.

A hidrólise tem como principal objetivo degradar celulose e a hemicelulose contidas na biomassa, transformando-as em moléculas de açúcares menores. Esse processo é necessário, pois as moléculas componentes desses polissacarídeos não são passíveis de fermentação, uma vez que são compostas pela junção de moléculas de glicose, no caso da celulose, e pela mistura de uma cadeia principal de xilose agregada a arabinoses, galactoses, manose, dentre outras, no caso da hemicelulose. Daí a necessidade da quebra desses polissacarídeos em moléculas menores, reduzindo-as a açúcares mais facilmente fermentescíveis. A hemicelulose é mais facilmente hidrolisada que a celulose, porém o processo de fermentação das pentoses obtidas ainda está em fase de desenvolvimento. A glicose resultante das moléculas de celulose, por sua vez, já é amplamente utilizada nos processos fermentativos de produção de etanol de primeira geração. As metodologias mais comumente utilizadas para tal etapa são conhecidas por hidrólise ácida (ácido concentrado ou diluído) e hidrólise enzimática. (BNDES e CGEE, 2008).

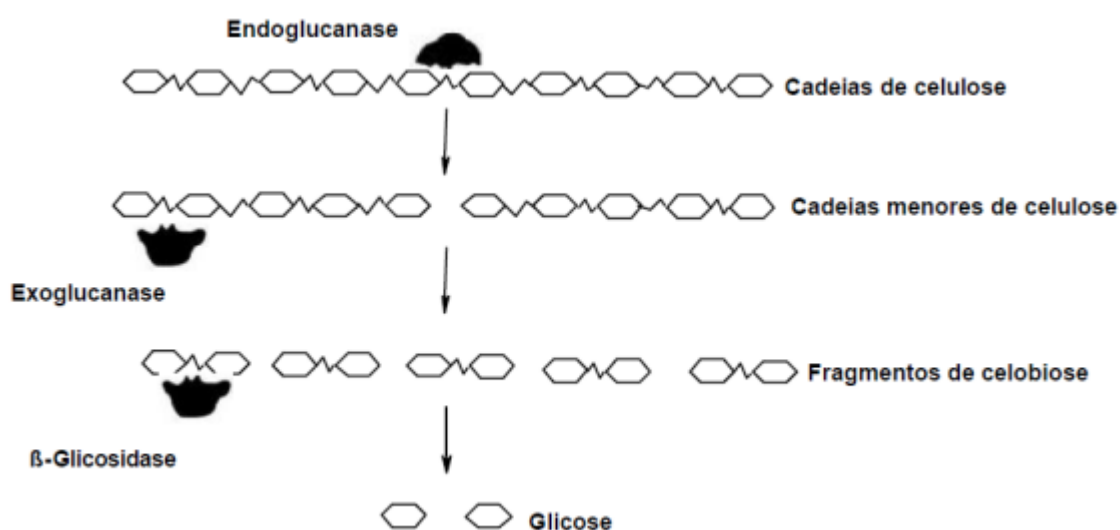
Para fins deste trabalho, a hidrólise da celulose presente na embalagem cartonada foi realizada por vias enzimáticas, dando enfoque a esta metodologia.

A hidrólise enzimática ocorre pela ação das celulasas, um conjunto de enzimas celulolíticas específicas que são capazes de degradar as moléculas de celulose, dando origem a uma mistura de moléculas menores de açúcares, tendo a glicose como a principal. As celulasas, representadas pela figura 4, são majoritariamente compostas por:

- Endoglucanases, que atuam sobre a área mais interna da fibra de celulose, regiões de baixa cristalinidade diminuindo, portanto, seu grau de polimerização e reduzindo a celulose à moléculas de glicose ou a compostos formados por algumas unidades de glicose, os chamados oligossacarídeos;
- Exoglucanases, que tem ação catalítica, segundo Bonomi et al. (2006, p. 31) “capaz de hidrolisar preparações celulósicas microcristalinas, atuando nas regiões terminais das moléculas de celulose e promovendo a sua despolimerização gradativa, por meio da remoção de unidades de celobiose”;

- β -glucosidase, responsáveis por transformar a celobiose em glicose por meio da quebra das ligações entre as moléculas de glicose que compõe a celobiose. Dessa forma, evitar o efeito inibidor que a celobiose causa nas endo e exoglucanases (BONOMI et al., 2006; ZANCHETTA, 2013).

Figura 4 - Ação das Celulases sobre a Molécula de Celulose



Fonte: Zanchetta (2013)

Tais enzimas celulolíticas podem ser adquiridas em sua forma isolada, pela compra direta de indústrias que as fabricam, ou a partir da utilização de micro-organismos, como fungos e bactérias, que conseguem sintetizar essas celulases, sendo capazes de degradar a celulose com suas próprias enzimas. No entanto, segundo CGEE (2009), são necessários investimentos para o desenvolvimento das enzimas atuais e pesquisas de enzimas novas a fim de aumentar a produtividade do processo, e talvez possível reutilização, uma vez que possuem preços mais elevados de compra.

Um dos impecílios à utilização de enzimas nesses processos está relacionado ao alto custo desses materiais. Como fato agravante, para Chies (2014), está a impossibilidade de reutilização dessas enzimas. Dessa forma, ocorre o

descarte após o uso, o que acaba gerando altos custos de reposição para a indústria. Tecnologias de imobilização de enzimas têm sido desenvolvidas a fim de reutilizá-las, porém este processo também gera custos, necessitando de um melhor desenvolvimento para que sua implantação seja compensada.

Após a hidrólise, o material deve ser submetido ao processo fermentativo. A fermentação alcoólica nada mais é que a ação de microrganismos sobre um substrato, tendo como produto a formação de álcool. De acordo com Damaso e Couri (2016), este processo é altamente empregado nas indústrias química, de alimentos, de bebidas, farmacêutica, dentre outras aplicações. Pode ser sintetizado em 4 etapas básicas: a preparação do meio fermentativo; a fermentação propriamente dita, com o uso de microrganismos (bactérias, fungos); tratamento do produto final, com a verificação da conformidade deste com o padrão almejado; e tratamento dos resíduos do processo.

Ademais, a fermentação pode ocorrer por duas rotas distintas: a fermentação submersa (FS), a qual ocorre, segundo Damaso e Couri (2016), “em meio com presença de água livre e normalmente com substratos solúveis”, citando a produção do próprio etanol de primeira geração como exemplo, e a fermentação em meio semissólido ou estado sólido (FMSS ou FES), também definida pelas autoras como “um processo fermentativo que ocorre na ausência ou quase ausência de água livre, onde o crescimento microbiano e a formação de produtos ocorrem na superfície de substratos sólidos”. Neste caso, o substrato analisado é a base sobre a qual os micro-organismos vão efetuar a fermentação. Comparativamente, a FMSS se sobressai em relação à FS por apresentar uma forma mais simples do preparo do meio. Proporciona um provável maior rendimento ausência de espuma, maior economia de energia (mais sustentável) e um maior controle de contaminação, uma vez que a proporção de água é pequena ou nula (DAMASO; COURI, 2016).

Existem diversos arranjos acerca do processamento dos materiais lignocelulósicos no que diz respeito à hidrólise e a fermentação, que podem variar de acordo com a composição destes materiais, procurando sempre um maior proveito da matéria-prima. Basicamente quatro formas são apresentadas:

- Hidrólise e Fermentação em Separado (SHF): como o nome sugere, hidrólise e fermentação ocorrem em diferentes tempos, sendo a hidrólise química ou

enzimática. Durante a hidrólise do substrato, pode haver a formação de produtos inibidores de fermentação, sendo necessária uma etapa de destoxificação para posterior fermentação, em separado;

- Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF): neste processo, hidrólise e fermentação são realizadas simultaneamente. Quando as enzimas do microrganismo utilizado transformam a celulose em moléculas de glicose, estas inibem a ação das β -glucosidases, interrompendo o processo hidrolítico. Dessa forma, o micro-organismo passa a se alimentar da glicose obtida, dando início ao processo fermentativo;
- Sacarificação com Co-fermentação Simultânea (SSCF): ocorre em 3 etapas, sendo a hidrólise da parcela de hemicelulose separada da etapa de produção das enzimas. Já a degradação da celulose e a fermentação acontecem ao mesmo tempo, inclusive das pentoses e hexoses. Daí a necessidade de micro-organismo mais específicos capazes de fermentar essas moléculas;
- Bioprocesso Consolidado (CBP): neste processo, no mínimo três etapas devem ocorrer: a hidrólise do material hemicelulósico (pré-tratamento), a hidrólise da celulose em si e a fermentação. Para tanto, necessita-se da ajuda da tecnologia e da engenharia genética para o desenvolvimento de microrganismos capazes de realizar todas essas etapas eficientemente (VÁSQUEZ, 2007).

2.7 A EMBALAGEM CARTONADA LONGA VIDA

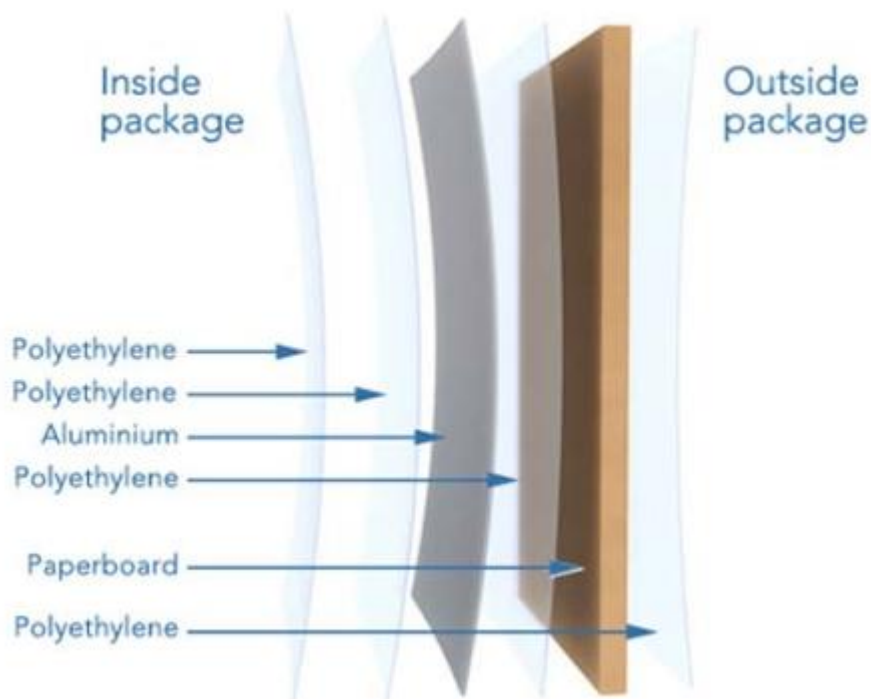
A embalagem cartonada longa vida está muito presente no cotidiano da sociedade, representada principalmente pelas usuais caixas de leite, e é responsável pelo armazenamento e pela proteção dos mais variados tipos de alimentos.

Uma das empresas mais reconhecidas quando se fala nesse tipo de embalagem é a Tetra Pak, fundada pelo Dr. Ruben Rausing, desenvolvedor do primeiro modelo, em 1946, desenvolvida na época com a finalidade de oferecer uma

maior higiene durante o envase do leite, gastando o menos possível com matéria-prima (TETRA PAK, 2016a).

Essa tecnologia foi introduzida no Brasil em 1957 pela Tetra Pak para o armazenamento de produtos líquidos, semilíquidos e viscosos. A embalagem é composta por seis camadas intercaladas entre polietileno (20% em massa), papel-cartão (75% em massa) e alumínio (5% em massa), como representado na figura 7. Cada camada possui uma função específica: o papel-cartão é composto por fibras de celulose e estrutura a embalagem; o polietileno protege contra a umidade do meio, promove a aderência entre as camadas e evita o contato direto do alumínio com o alimento, além de ser um termoplástico, ou seja, pode dar origem a novos produtos após seu aquecimento; e o alumínio, que impede a passagem de luz, oxigênio, água, microrganismos e outros agentes externos através da embalagem. São extremamente leves e permitem o armazenamento dos alimentos por um período longo de tempo (ZORTEA, 2001; TETRA PAK, 2016b; CEMPRE).

Figura 5 - Disposição das Camadas Componentes da Embalagem Cartonada Longa Vida



Fonte: Tetra Pak (2016b)

Devido ao intenso uso desse tipo de embalagem pela população, um grande volume de resíduos é gerado que, em caso de não reciclagem, são diretamente destinados aos lixões e aos aterros, incrementando a produção de lixo nestes locais. Atualmente, existem diversos meios de reutilização dessas embalagens após o descarte: podem ser diretamente recicladas a partir de um processo de prensa, promovendo chapas que são utilizadas em móveis e em divisórias; de forma indireta, depois da separação de seus componentes (papel, alumínio e polietileno), com as formas de beneficiamento adequadas a cada um; no artesanato, dão origem aos mais diversos produtos. Em 2012, a reciclagem de materiais cartonados longa vida superou a marca das 60 mil toneladas, e só tende a crescer, já que as atividades de coleta seletiva têm sido cada vez mais incentivadas, bem como um aumento de uma visão mais sustentável da produção de resíduos e da necessidade de seu reaproveitamento (CEMPRE, 2016; NASCIMENTO, 2007).

Dessa forma, a produção de etanol a partir dessas embalagens daria uma rota alternativa ao destino de tais resíduos. Uma vantagem nesse processo quando comparado ao da produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço da cana-de-açúcar é a de que o papel contido nas embalagens cartonadas é composto apenas por camadas de celulose, não sendo necessário, portanto, o pré-tratamento citado na seção 3.6, facilitando o processo e diminuindo seu tempo e seus custos, além de contribuir para a diminuição da produção de lixo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

O papel cartão contido nas embalagens cartonadas longa vida é o principal material de estudo deste trabalho, oferecendo uma alternativa de reutilização destes resíduos amplamente gerados pela sociedade. Tais embalagens foram doadas pela comunidade, e os complexos enzimáticos Cellic HTec2 e Cellic CTec2 responsáveis pela degradação da celulose contida no papel - ambos da Novozymes - foram gentilmente cedidos pela empresa fabricante.

4.2 MÉTODOS

Foram realizados vários experimentos acerca da produção de etanol de segunda geração tendo a embalagem cartonada longa vida como matéria-prima. Tanto os testes iniciais quanto os experimentos oficiais se desenvolveram nas dependências da UTFPR Câmpus Ponta Grossa utilizando principalmente o Laboratório de Iniciação Científica, tendo também o Laboratório de Microbiologia como ponto de apoio e o Laboratório de Métodos Instrumentais como local para as análises finais.

4.2.1 Extração da Matéria-Prima

A embalagem cartonada longa vida é composta por camadas de polietileno, alumínio e celulose. Apenas a de celulose foi utilizada como matéria-prima neste estudo, sendo, portanto, interessante promover a separação dela das outras camadas presentes na embalagem.

Com o objetivo de extrair o papel cartão contido no interior das embalagens, estas foram abertas e imersas em água por um período de 24 horas. A presença da água facilita a separação das camadas componentes da caixa. Segregadas, as camadas de papel cartão foram trituradas em liquidificador convencional. Um volume grande de água foi adicionado para auxiliar o processo, do qual se obteve uma pasta, que foi secada em estufa a 80 °C por um período de 24 horas. O papel triturado e seco está representado pela figura 6.

Figura 6 - Papel Cartão Triturado e Seco



Fonte: Autoria própria (2017)

4.2.2 Degradação da Celulose

A degradação da celulose contida no papel cartão ocorreu a partir de dois complexos enzimáticos, usados separadamente, ambos da empresa Novozymes: Cellic HTec2 (NS-22244) e Cellic CTec2. Possuem pH e temperaturas ótimas próximos, 5-5,5 e 45-50°C, respectivamente. A figura 7.a e 7.b apresenta as embalagens dos complexos Cellic HTec2 e Cellic CTec2, respectivamente.

Figura 7 – Complexos Enzimáticos: (a) Cellic HTec2 (NS-22244) e (b) Cellic CTec2



(a)

(b)

Fonte: Autoria Própria (2017)

4.2.3 Fermentação da Glucose

A fim de possibilitar a fermentação da glucose obtida após a hidrólise da celulose pelas enzimas, utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, representada pela figura 8, da marca Dr. Oetker, facilmente encontrada na maioria dos supermercados do município de Ponta Grossa.

A fermentação ocorreu simultaneamente à degradação da celulose, processo conhecido como Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF). Sem a presença da levedura, a produção do etanol não seria viabilizada, obtendo-se apenas uma solução de água e glucose hidrolisada pelas enzimas atuantes no meio analisado.

Figura 8 - Levedura *Saccharomyces cerevisiae*



Fonte: Autoria Própria (2017)

4.2.4 Preparação das Amostras

Para alocação dos experimentos, utilizaram-se kitassatos de 250 mL como fermentadores, disponibilizados pelo laboratório de Engenharia Química, bem como as rolhas, as mangueiras e os béqueres. Não houve necessidade de autoclavar a vidraria nem os outros materiais utilizados.

Inicialmente, algumas concentrações aleatórias de papel cartão *versus* enzima *versus* levedura foram testadas apenas para se ter um norteamento de qual seria a melhor forma de relacionar os três parâmetros entre si. Determinou-se que os experimentos oficiais seriam realizados com 2 g de papel cartão, 0,5 g de levedura, alterando-se os volumes dos complexos entre 200 μ L e 600 μ L, sempre em duplicata, para cada período de tempo analisado.

Por ser um experimento em escala laboratorial, e também a partir do direcionamento fornecido pelos testes realizados previamente, determinou-se que o período de hidrólise e fermentação ao qual as amostras seriam submetidas seria de 24, 48 e 72 horas para cada preparação enzimática utilizada. Dessa forma, para Cellic HTec2 foram preparados 12 fermentadores: 6 com 200 μ L em volume de enzima e 6 com 600 μ L. O fermentador 1 possuía, além do papel cartão, da levedura e da água, 200 μ L da enzima, e teve um período de degradação e fermentação de

24 horas. O fermentador 2, por se tratar da duplicata do 1, possuía as mesmas características e também foi retirado da Incubadora *Shaker* após 24 horas do início do processo. As duplas de fermentadores 3 e 4 e 5 e 6 possuíam a mesma quantidade de enzima e foram retirados após 48 e 72 horas, respectivamente. O mesmo processo foi repetido para os fermentadores 7, 9 e 11 e suas duplicatas 8, 10 e 12, alterando-se apenas o volume da preparação enzimática para 600 μL . A tabela 2 mostra o planejamento fatorial acerca da produção do etanol montado com as condições dos experimentos por enzima utilizada, sendo a enzima, o volume utilizado e o tempo as variáveis independentes, para uma escala laboratorial.

Tabela 2 - Planejamento Fatorial para Produção de Etanol em Escala Laboratorial.

Tratamentos	Variável Independente		
	Enzima	Volume (μL)	Tempo (h)
1	Cellic HTec2	200	24
2	Cellic HTec2	200	24
3	Cellic HTec2	200	48
4	Cellic HTec2	200	48
5	Cellic HTec2	200	72
6	Cellic HTec2	200	72
7	Cellic HTec2	600	24
8	Cellic HTec2	600	24
9	Cellic HTec2	600	48
10	Cellic HTec2	600	48
11	Cellic HTec2	600	72
12	Cellic HTec2	600	72
1	Cellic CTec2	200	24
2	Cellic CTec2	200	24
3	Cellic CTec2	200	48
4	Cellic CTec2	200	48
5	Cellic CTec2	200	72
6	Cellic CTec2	200	72
7	Cellic CTec2	600	24
8	Cellic CTec2	600	24
9	Cellic CTec2	600	48
10	Cellic CTec2	600	48
11	Cellic CTec2	600	72
12	Cellic CTec2	600	72

Fonte: Autoria Própria (2017)

As amostras foram preparadas e as quantidades de papel colocados em cada kitassato, para cada enzima, bem como os volumes finais foram anotados, conforme mostram as tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Composição das Amostras com Cellic HTec2

Amostra	Massa de Papel (g)	Volume Líquido (mL)	Volume de Enzima (µL)
1	2,00	52,10	200
2	2,00	52,1	200
3	2,02	54,54	200
4	2,02	53,02	200
5	2,05	54,37	200
6	2,02	53,95	200
7	2,03	54,40	600
8	2,03	52,23	600
9	2,01	52,22	600
10	2,02	53,03	600
11	2,01	50,84	600
12	2,05	57,33	600

Fonte: Autoria Própria (2017)

Tabela 4 - Composição das Amostras com Cellic CTec2

Amostra	Massa de Papel (g)	Volume Líquido (mL)	Volume de Enzima (µL)
1	2,00	51,90	200
2	2,00	51,40	200
3	2,00	52,00	200
4	2,00	51,40	200
5	2,00	52,40	200
6	2,00	51,90	200
7	2,00	51,90	600
8	2,00	52,40	600
9	2,00	51,50	600
10	2,00	52,30	600
11	2,00	51,60	600
12	2,00	51,70	600

Fonte: Autoria Própria (2017)

4.2.5 Produção De Etanol de Segunda Geração Por Enzimas Industriais

Após o preparo das amostras em que a enzima Cellic HTec2 estava sendo utilizada, estas foram colocadas em Incubadora *Shaker* TE-420, da marca Tecnal (figura 9), para agitação constante dos fermentadores, a fim de estabelecer a mistura entre os componentes e uma boa homogeneização. O processo de degradação e fermentação deu-se à temperatura de 50°C, como indicado pelas informações técnicas sobre temperaturas ótimas do apêndice A, a cerca de 115 rotações por minuto (RPM).

Figura 9 – Incubadora *Shaker* Utilizada para Agitação das Amostras



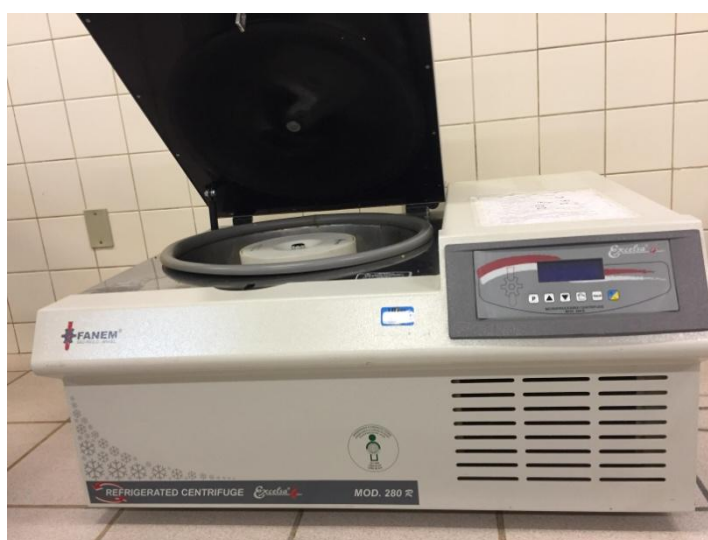
Fonte: Autoria Própria (2017)

Passado o período previamente estipulado de permanência para cada um, os frascos foram sendo identificados e armazenados no congelador do Laboratório de Iniciação Científica, a cerca de -5°C, para interromper o processo de degradação da enzima, uma vez que estas se tornam inativas a baixas temperaturas. O mesmo procedimento foi repetido para os fermentadores contendo a enzima Cellic CTec2.

O produto obtido após a degradação e fermentação ainda possuía alguns resíduos de embalagem cartonada, portanto, partículas sólidas. A fim de segregar

apenas o conteúdo líquido, as amostras foram centrifugadas à temperatura de 20°C por 15 minutos em centrífuga, Mod. 280 R, da marca Excelsa, disponível no laboratório de Iniciação Científica da UTFPR, explicitada na figura 10. O líquido resultante da centrifugação de cada fermentador após o processo foi acondicionado em tubos Falcon limpos, que retornaram ao congelador para posterior análise de quantificação por Cromatografia Gasosa.

Figura 10 - Centrífuga Utilizada no Preparo das Amostras



Fonte: Autoria Própria (2017)

4.2.6 Quantificação Do Etanol por CG

As análises para qualificação e quantificação do etanol presente foram feitas no Cromatógrafo a Gás 6100GC, da marca Young Lin, com detector por ionização de chama (DIC), disponível no Laboratório de Métodos Instrumentais da UTFPR, representado pela figura 11.

Figura 11 - Cromatógrafo a Gás



Fonte: Autoria Própria (2017)

As condições experimentais foram estipuladas e analisadas no ato da realização dos experimentos. A coluna capilar utilizada no interior do equipamento foi a ZB-WAX, de dimensões 30 metros, 0,25 milímetros e 0,25 micrômetros e as condições da análise foram as seguintes:

- Headspace estático HT200H, à temperatura de 60°C, sob agitação constante por 10 minutos;
- Temperatura do injetor: 200°C;
- Temperatura do detector: 230°C;
- Gás de arraste: nitrogênio, a um fluxo de 1,5 mL.min⁻¹;
- Injeção do split na proporção 1:1,2;
- Programação da temperatura do forno: 40°C por um período de 5 minutos, seguidos da elevação da temperatura em 25°C.min⁻¹ a 215°C, com tempo de retenção total de 13 minutos de análise.

Para auxiliar no processo de quantificação do etanol, a construção da curva de calibração deu-se com a análise de soluções feitas a partir de um padrão externo

de etanol (J. T. Baker). Para a solução padrão, 3 mL de etanol foram pesados em um balão volumétrico de 100 mL previamente tarado, com massa resultante de 2,3493 g. Em seguida, acrescentou-se água ultra-pura até a marcação dos 100 mL do balão, obtendo-se uma solução de concentração $23,493 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol. Em vials de 20 mL, 1 g de sulfato de sódio e alíquotas do padrão em triplicata foram misturadas com água ultra-pura, totalizando 5 mL. Tais amostras foram analisadas pelo CG, e o pico referente à presença do etanol foi exibido com tempo de retenção de 4 minutos. A partir dos cromatogramas gerados pelo software acoplado ao equipamento pode-se identificar a área de cada pico de etanol. Por se tratar de uma triplicata, fez-se a média das áreas e o desvio padrão foi calculado. Com os dados da média das áreas e a concentração de cada uma das amostras obtiveram-se oito pontos sobre os quais a curva foi construída. A equação da reta fornecia em “y” o valor referente à área do pico do etanol e em “x” a quantidade de etanol relativa àquela área.

Com a curva de calibração determinada, descongelaram-se as amostras e iniciaram-se as análises para cada uma delas, em duplicata para maior confiabilidade da leitura do equipamento. Em vial de 20 mL, foram utilizados 1 g de sulfato de sódio e 5 mL da amostra a ser quantificada. Durante a análise da primeira para embasamento para a construção da curva, notou-se que o tempo de análise duraria cerca de 23 minutos: 10 minutos para agitação do vial e 13 minutos referentes ao processo de eluição no interior da coluna e posterior quantificação do etanol. Programou-se o equipamento para atingir a temperatura de 230°C , a fim de eliminar qualquer resquício de outro componente na coluna e não comprometer as próximas análises. Ao final de cada uma, o software fornecia o cromatograma referente ao processo e a área sob a curva referente à produção do etanol.

Para quantificação do etanol, também se fez a média das duas áreas e substituiu-se o valor obtido no lugar de “y” da equação de reta da curva de calibração.

4.2.7 Modelamento Empírico

Realizou-se o modelamento empírico para tratamento dos dados utilizando-se o Microsoft Excel (2013) com a finalidade de se estabelecer se houve significância acerca dos experimentos analisados e para a determinação de quais variáveis mais influenciaram os resultados obtidos. Determinou-se o Grau de Liberdade (GL) e realizaram-se os Testes F e T para análise da significância das variáveis relacionadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o descrito na metodologia deste trabalho, após a degradação e fermentação as amostras foram congeladas para posterior análise por Cromatografia Gasosa. O processo de quantificação do etanol iniciou-se pela construção da curva de calibração. O padrão externo possuía concentração de 23,493 g.L⁻¹. Para a curva, utilizaram-se pontos obtidos a partir da leitura de amostras em volumes variados do padrão de etanol, como descrito na tabela 5, com volume final sempre equivalente a 5 mL.

Tabela 5 - Volumes Utilizados para Construção da Curva de Calibração

Ponto da Curva de Calibração	Volume em etanol (mL)	Volume em água (mL)	Volume total (mL)
1	5	0	5
2	3	2	5
3	2	3	5
4	1	4	5
5	0,5	4,5	5
6	0,25	4,75	5
7	0,15	4,85	5
8	0,05	4,95	5

Fonte: Autoria Própria (2017)

Para maior confiabilidade dos resultados, as análises foram feitas em triplicata (A, B e C). A tabela 6 mostra as concentrações de etanol para cada ponto analisado e os resultados das médias das leituras pelo cromatógrafo, com os respectivos desvios padrão (DP) e os coeficientes de variação (CV).

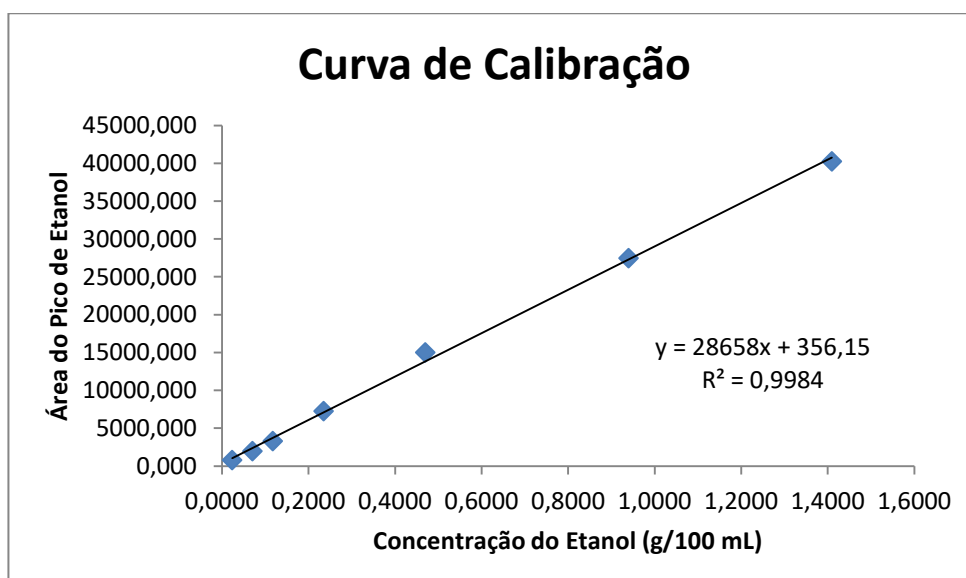
Tabela 6 - Resultados das Análises das Amostras com Solução Padrão de Etanol para Construção da Curva de Calibração

Ponto da Curva	Concentração Etanol (g/100 mL)	Concentração Etanol (g/L)	Média das Áreas	DP	CV
1	2,3493	23,493	60821,772	1497,026	2,461
2	1,40958	14,0958	40261,121	72,842	0,181
3	0,93972	9,3972	27473,050	617,779	2,249
4	0,46986	4,6986	15013,829	715,406	4,765
5	0,23493	2,3493	7260,085	287,947	3,966
6	0,117465	1,17465	3301,896	299,346	9,066
7	0,070479	0,70479	1974,051	139,478	7,066
8	0,023493	0,23493	793,131	19,213	2,422

Fonte: Autoria Própria (2017)

O gráfico 2 representa a curva de calibração criada a partir destes dados. O ponto 1 da curva de calibração foi desconsiderado por ter afetado o valor do R^2 , diminuindo-o. Dessa forma, utilizaram-se apenas os outros 7 pontos.

Gráfico 2 - Curva de Calibração Obtida Após Análises de Amostras com Concentrações Variadas do Padrão Externo de Etanol



Fonte: Autoria Própria (2017)

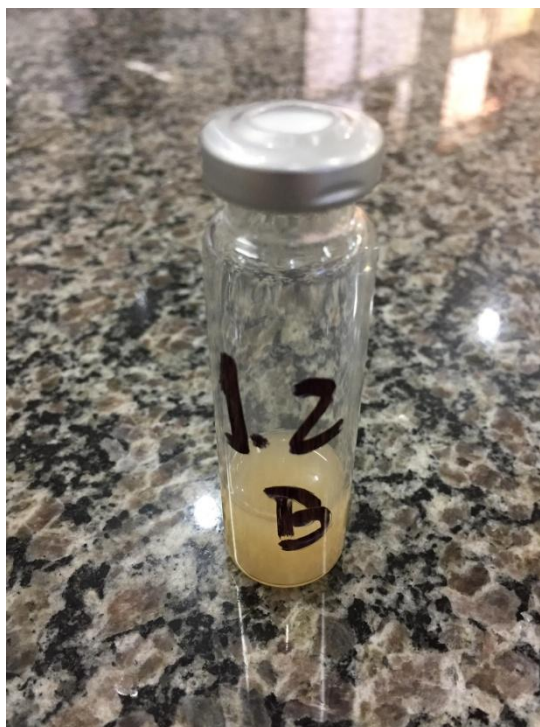
A equação (1) representa a equação de reta da curva de calibração obtida a partir da linha de tendência construída:

$$y = 28658x + 356,15 \quad (1)$$

Onde x representa a quantidade de etanol produzida (g/100 mL) e y a área do pico referente, estabelecendo-se uma relação linear entre essas duas variáveis.

Após a criação da curva de calibração, as amostras oficiais começaram a ser analisadas. A figura 12 exemplifica uma amostra preparada para ser submetida à cromatografia gasosa, seguindo os procedimentos já descritos.

Figura 12 - Amostra para Análise por Cromatografia Gasosa

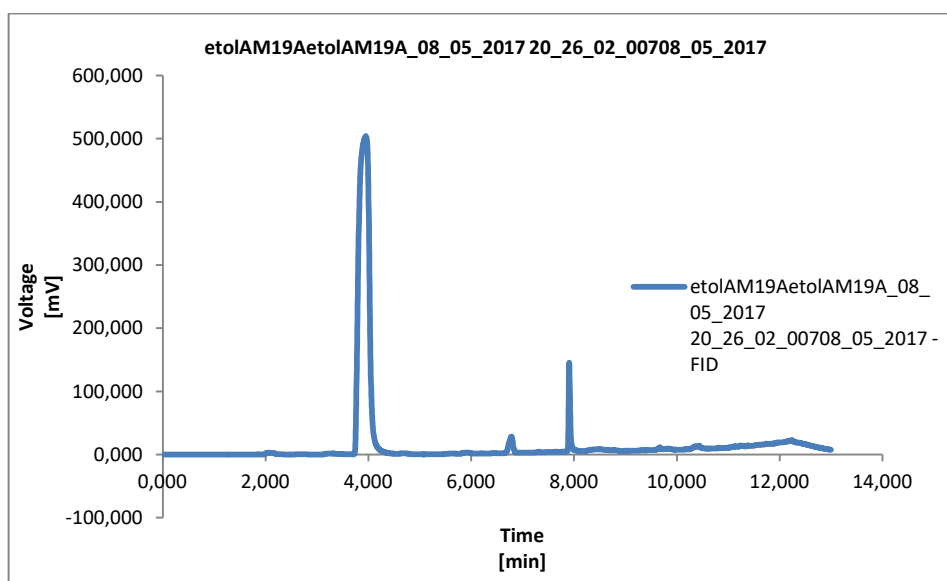


Fonte: Autoria Própria (2017)

5.1 TRATAMENTO COM COMPLEXO ENZIMÁTICO CELLIC HTEC2

O gráfico 3 representa um exemplo de perfil cromatográfico gerado pelo equipamento a partir da análise da amostra 9 após a produção do etanol de segunda geração, tendo os demais cromatogramas obtidos praticamente o mesmo perfil. O pico mais alto do gráfico refere-se à presença do etanol, com tempo de retenção próximo de quatro minutos, e se utilizando do valor expresso pela área desta curva é possível determinar a quantidade do produto obtido. A relação entre a área do pico do etanol e a quantidade do componente na amostra foi feita da mesma maneira de quando se construiu a curva de calibração.

Gráfico 3 - Cromatograma Referente à Análise da Amostra 9 Tratada com Complexo Enzimático Cellic HTec2



Fonte: Aatoria Própria (2017)

A tabela 7 mostra os resultados das áreas dos picos de etanol para análises, feitas em duplicata para cada amostra (área A e área B). São apresentadas as áreas obtidas em cada leitura, a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo.

Tabela 7 - Áreas Obtidas após as Leituras das Amostras Tratadas com o Complexo Cellic HTec2

Amostra	Área A	Área B	Média das Áreas	DP	CV
1	4063,87	4160,65	4112,26	68,43	1,66
2	3434,52	3678,52	3556,52	172,53	4,85
3	4082,15	4547,61	4314,88	329,13	7,63
4	5607,88	5596,81	5602,35	7,83	0,14
5	3364,41	3464,02	3414,21	70,44	2,06
6	2291,60	2272,90	2282,25	13,22	0,58
7	5968,07	6172,68	6070,38	144,68	2,38
8	9281,62	10859,40	10070,51	1115,65	11,08
9	7137,30	7189,18	7163,24	36,69	0,51
10	14149,46	14903,13	14526,29	532,92	3,67
11	7648,98	7407,09	7528,04	171,04	2,27
12	11693,38	12436,77	12065,08	525,66	4,36

Fonte: Autoria Própria (2017)

A tabela 8, por sua vez, fornece os resultados da quantificação do etanol após os valores das áreas serem aplicadas à equação (1) fornecida pela curva de calibração. Com a determinação das quantidades de etanol obtidas para cada amostra, fez-se a média, o desvio padrão, o desvio padrão relativo ou CV. Além disso, a tabela apresenta a relação da quantidade de etanol produzida, em gramas, para cada ensaio realizado, de acordo com o volume inicial: multiplicando-o pela média dos valores produzidos encontra-se a quantidade de combustível produzido para o ensaio em questão.

Tabela 8 - Quantificação do Etanol nas Amostras após Tratamento com a Preparação Enzimática Cellic HTec2

Amostra	Concentração de Etanol Área A (g/100 mL)	Concentração de Etanol Área B (g/100 mL)	Média (g/100 mL)	DP	CV	Volume (mL)	Massa de Etanol (g)
1	0,129	0,133	0,131	0,00239	1,822	52,1	0,068
2	0,107	0,116	0,112	0,00602	5,391	52,1	0,058
3	0,130	0,146	0,138	0,01148	8,314	54,5	0,075
4	0,183	0,183	0,183	0,00027	0,149	53,0	0,097
5	0,105	0,108	0,107	0,00246	2,303	54,4	0,058
6	0,068	0,067	0,067	0,00046	0,686	54,0	0,036
7	0,196	0,203	0,199	0,00505	2,532	54,4	0,108

Amostra	Concentração de Etanol Área A (g/100 mL)	Concentração de Etanol Área B (g/100 mL)	Média (g/100 mL)	DP	CV	Volume (mL)	Massa de Etanol (g)
8	0,311	0,367	0,339	0,03893	11,485	52,2	0,177
9	0,237	0,238	0,238	0,00128	0,539	52,2	0,124
10	0,481	0,508	0,494	0,01860	3,761	53,0	0,262
11	0,254	0,246	0,250	0,00597	2,385	50,8	0,127
12	0,396	0,422	0,409	0,01834	4,489	57,3	0,234

Fonte: Autorial Própria (2017)

Sabendo-se da quantidade de etanol produzida por amostra analisada, como indicado na coluna “Massa de Etanol (g)” da Tabela 8, pode-se estabelecer uma relação linear com a massa de substrato utilizada para se descobrir quanto do combustível seria produzido por tonelada de papel cartão tratado com o complexo Cellic HTec2. Pode-se estimar o volume do produto obtido para cada amostra, em cada uma das condições, pela seguinte relação: dividindo-se a quantidade de etanol, em gramas, por sua densidade ($0,789 \text{ g.cm}^{-3}$) obteve-se o volume de etanol produzido para 100 g de matéria-prima utilizada, em mL. Usando uma relação linear simples, é possível determinar a massa de etanol que seria produzido utilizando-se uma tonelada de papel cartão. Os dados estão expressos na tabela 9.

Tabela 9 - Quantidade de Etanol a Ser Produzida por Tonelada de Papel Cartão Tratado com Complexo Enzimático Cellic HTec2

Amostra	Massa de Etanol (g)	Substrato (g)	Massa de Etanol por Tonelada de Substrato (g)	Volume Etanol por Tonelada de Substrato (L)	DP	CV
1	0,068	2	34142,85	43,27		
2	0,058	2	29091,22	36,87	4,527	11,298
3	0,075	2	37669,94	47,74		
4	0,097	2	48529,80	61,51	9,733	17,817
5	0,058	2	29008,81	36,77		
6	0,036	2	18129,82	22,98	9,750	32,638
7	0,108	2	54235,10	68,74		
8	0,177	2	88523,44	112,20	30,729	33,967
9	0,124	2	62018,71	78,60		
10	0,262	2	131080,49	166,13	61,894	50,579

Amostra	Massa de Etanol (g)	Substrato (g)	Massa de Etanol por Tonelada de Substrato (g)	Volume Etanol por Tonelada de Substrato (L)	DP	CV
11	0,127	2	63615,51	80,63		
12	0,234	2	117117,88	148,44	47,949	41,865

Fonte: Autoria Própria (2017)

A partir dos resultados obtidos, é notável que se obteve uma maior produção de etanol nas amostras em que foram colocados 600 μ L da enzima Cellic HTec2, no período de 48 horas de agitação, especialmente na amostra 10 onde foram produzidos 0,262 g de etanol. No entanto, não houve uma boa repetibilidade dos resultados entre os pares de amostras analisados, comprovado pelos valores de desvio padrão e coeficiente de variação expressos nas colunas “DP” e “CV” da tabela 9, respectivamente. Uma série de fatores podem ter contribuído para isso, afetando o desenvolvimento dos experimentos. A composição do papel cartonado provavelmente é desigual entre suas partes, além de possuir uma granulometria muito variada. Essa variação, em conjunto com uma possível falha ou não perfeita homogeneização da Incubadora *Shaker* pode ter comprometido a agitação das amostras, fazendo com que a enzima não alcançasse todo o volume de substrato para degradação.

Além disso, o fato desta enzima possuir um potencial maior para degradação de hemicelulose pode colaborar para uma degradação incompleta da matéria-prima, composta basicamente por celulose. De acordo com a literatura, esta preparação geralmente é empregada em conjunto com outra, como um benefício adicional para a degradação de possíveis quantidades de hemiceluloses que estejam presentes (BRAHMACHARI, 2017).

5.2 TRATAMENTO COM COMPLEXO ENZIMÁTICO CELLIC CTEC2

As amostras em que a preparação Cellic CTec2 foi utilizada passaram pelo mesmo procedimento de análise, tendo os resultados das áreas expostos na tabela 10 e os valores de etanol quantificado em cada uma na tabela 11.

Tabela 10 - Áreas Obtidas após as Leituras das Amostras Tratadas com o Complexo Cellic CTec2

Amostra	Área A	Área B	Média das Áreas	DP	CV
1	3196,07	2746,34	2971,20	318,00	10,70
2	5698,48	5690,30	5694,39	5,78	0,10
3	4996,68	5481,29	5238,98	342,67	6,54
4	1544,41	1544,35	1544,38	0,04	0,00
5	1847,47	1852,71	1850,09	3,71	0,20
6	3883,67	3923,58	3903,62	28,22	0,72
7	8527,45	9672,75	9100,10	809,85	8,90
8	8149,31	8810,02	8479,67	467,20	5,51
9	12665,51	12363,34	12514,42	213,67	1,71
10	11506,55	10995,39	11250,97	361,44	3,21
11	8731,80	8712,45	8722,12	13,68	0,16
12	10486,57	10871,78	10679,18	272,38	2,55

Fonte: Autoria Própria (2017)

Tabela 11 - Quantificação do Etanol nas Amostras após Tratamento com a Preparação Enzimática Cellic CTec2

Amostra	Concentração de Etanol Área A (g/100 mL)	Concentração de Etanol Área B (g/100 mL)	Média (g/100 mL)	DP	CV	Volume (mL)	Massa de Etanol (g)
1	0,099	0,083	0,09125	0,0111	12,160	51,9	0,047
2	0,186	0,186	0,186274	0,0002	0,108	51,4	0,096
3	0,162	0,179	0,170383	0,0120	7,018	52	0,089
4	0,041	0,041	0,041462	0,0000	0,003	51,4	0,021
5	0,052	0,052	0,05213	0,0001	0,248	52,4	0,027
6	0,123	0,124	0,123787	0,0010	0,796	51,9	0,064
7	0,285	0,325	0,305114	0,0283	9,262	51,9	0,158
8	0,272	0,295	0,283464	0,0163	5,751	52,4	0,149
9	0,430	0,419	0,424254	0,0075	1,757	51,5	0,218

Amostra	Concentração de Etanol Área A (g/100 mL)	Concentração de Etanol Área B (g/100 mL)	Média (g/100 mL)	DP	CV	Volume (mL)	Massa de Etanol (g)
10	0,389	0,371	0,380167	0,0126	3,318	52,3	0,199
11	0,292	0,292	0,291925	0,0005	0,164	51,6	0,151
12	0,353	0,367	0,360214	0,0095	2,639	51,7	0,186

Fonte: Autoria Própria (2017)

Como feito para o complexo enzimático anterior, é possível relacionar a massa de substrato utilizada e a massa de etanol produzida para se descobrir quanto do combustível seria produzido por tonelada de papel cartão tratado com o complexo Cellic CTec2, valores expressados na tabela 12.

Tabela 12 - Quantidade de Etanol a Ser Produzida por Tonelada de Papel Cartão Tratado com Complexo Enzimático Cellic CTec2

Amostra	Quantidade de Etanol (g)	Substrato (g)	Quantidade de Etanol por Tonelada de Substrato (g)	Volume Etanol por Tonelada de Substrato (L)	DP	CV
1	0,047	2	23679,47	30,01		
2	0,096	2	47872,38	60,67	21,68	47,82
3	0,089	2	44299,57	56,15		
4	0,021	2	10655,84	13,51	30,15	86,58
5	0,027	2	13658,06	17,31		
6	0,064	2	32122,60	40,71	16,55	57,04
7	0,158	2	79176,99	100,35		
8	0,149	2	74267,60	94,13	4,40	4,52
9	0,218	2	109245,42	138,46		
10	0,199	2	99413,63	126,00	8,81	6,66
11	0,151	2	75316,53	95,46		
12	0,186	2	93115,44	118,02	15,95	14,94

Fonte: Autoria Própria (2017)

Analisando os dados das tabelas referentes ao tratamento com a preparação enzimática Cellic CTec2, conclui-se que o maior rendimento também ocorreu quando o volume de 600 μ L foi aplicado, no intervalo de tempo de 48 horas, em que foram produzido 0,218 g de combustível no fermentador analisado, sendo esta uma

quantidade minimamente satisfatória para a degradação do papel cartão. A repetibilidade dos resultados entre as duplicatas das amostras para este complexo enzimático foi satisfatória, visto pelo desvio padrão e pelo coeficiente de variação calculados e exemplificados pelas colunas “DP” e “CV” da tabela 8, respectivamente. O mesmo não pode ser dito sobre os resultados em que o volume utilizado foi de 200 μL , onde se obtiveram resultados mais distintos entre as duplicatas, provavelmente pelos mesmos motivos explicitados para a primeira enzima: variação na composição e na granulometria da matéria-prima e à não perfeita homogeneização da Incubadora *Shaker*, além da menor concentração enzimática. Cellic CTec2 possui uma quantidade mais agressiva de celulases em sua composição, o que contribui para uma maior e mais contínua degradação do papel cartão, não tão regular nos experimentos com o complexo Cellic HTec2 (LUCARINI et al, 2017).

Lucarini et al. (2017) comenta ainda que obteve resultados mais satisfatórios acerca da degradação da palha de cana-de-açúcar após 24 horas de hidrólise enzimática. No entanto, no presente trabalho a fermentação ocorre simultaneamente à degradação da matéria-prima, fato que pode ter retardado a eficiência do processo, além da diferença entre a composição da matéria-prima utilizada.

O modelamento empírico realizado a partir dos dados referentes às áreas obtidas forneceu graus de liberdade (GL) nos valores de 4 e de 43 e uma regressão múltipla linear (r^2) de 0,772878. Após a realização dos cálculos cabíveis, determinou-se o Teste F, com um valor de 14,13047. Como este valor foi superior a 10, concluiu-se que a regressão foi significativa e que os resultados obtidos estabelecem uma relação matemática entre si.

Em seguida, realizou-se o Teste T para as variáveis constante (K), volume de complexo enzimático utilizado, tempo, tempo elevado ao quadrado (t^2) e a interação entre volume e tempo. Concluiu-se que apenas as variáveis volume e tempo elevado ao quadrado apresentaram significância, uma vez que os resultados obtidos em cada uma obtiveram o mesmo sinal matemático entre si (para volume ambos foram positivos e para tempo ao quadrado, negativos), sendo os valores para a variável tempo mais expressivos que os de volume.

Dessa forma, pode-se entender que o tempo apresentou maior influência sobre os resultados analisados quando comparado à influência causada pelo volume de complexo enzimático utilizado. Isso se deve provavelmente ao fato da pequena diferença entre os utilizados – 200 μL e 600 μL . Se a quantidade de enzimas fosse maior, o tempo poderia ter diminuído. No entanto, o gasto com o material enzimático seria ainda mais alto.

5.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Entre todas as análises realizadas, a amostra que mais produziu etanol foi a 10 em que a preparação Cellic HTec2 foi utilizada, como mostrado na tabela 9. No entanto, como não houve uma boa reprodutibilidade entre a maioria das suas duplicatas, considera-se que a melhor produção advém da amostra 9, bem como de sua duplicata, referentes ao segundo complexo utilizado, Cellic CTec2. Notou-se que esta preparação apresentou uma tendência a ser mais padronizada que a Cellic HTec2, obtendo resultados mais regulares e satisfatórios. Isso pode ser comprovado pelos valores dos coeficientes de variação mostrados na tabela 12, menores quando comparados aos obtidos para o complexo Cellic HTec2. Para as amostras em que foi utilizado o volume de 600 μL tais valores foram pequenos e aceitáveis. Tudo isso se deve provavelmente ao fato de a preparação Cellic CTec2 conter uma quantidade de celulases mais expressiva do que a Cellic HTec2, a qual possui um potencial maior para degradação de hemicelulose. Como explicitado anteriormente, esta geralmente é utilizada em conjunto com outras enzimas para potencializar a degradação do material.

O rendimento da hidrólise é coordenado por uma série de fatores, como a temperatura, a velocidade da agitação, a concentração do substrato, a quantidade da(s) enzima(s) utilizada(s), dentre outras variáveis. Dessa forma, a alteração de qualquer uma destas pode influenciar nos resultados dos experimentos. A quantidade de enzima a ser utilizada determina quanto do material será hidrolisado, refletindo diretamente na obtenção do produto final. Se a degradação não é

eficiente, nem todas as moléculas de celulose serão reduzidas a moléculas de glicose, as quais não sofrerão o processo fermentativo realizado pela levedura.

A velocidade de agitação, por exemplo, pode interferir muito no rendimento final, pois é a partir dela que ocorrerá a relação entre a enzima e o substrato a ser hidrolisado. Se a agitação não for bem executada, o transporte da enzima pelo substrato será afetado e, dessa forma, a reação de hidrólise não será a melhor e mais rentável possível (ZABOTTI, 2014; CARVALHO, 2011).

Como ainda não existem outros estudos acerca da produção de etanol de segunda geração a partir da matéria-prima utilizada neste trabalho, não há dados para efeito de comparação. Pode-se fazer uma analogia aos valores de produção do combustível a partir do bagaço da cana, processo que gera cerca de 69,1 litros por tonelada de substrato, em condições de tecnologia medianas. Otimizando-se o processo a partir de melhorias nos processos de sacarificação e fermentação, acredita-se alcançar até 149,3 litros a partir de uma tonelada de bagaço (NOVA CANA, 2017).

Pode-se comparar ainda com a produção de etanol de primeira geração a partir do milho, por exemplo, em que o rendimento é de cerca de 460 litros por tonelada do vegetal. Já a tonelada de cana de açúcar permite a produção de 85 a 90 litros do produto. O grande diferencial entre os dois está no processo de fermentação: o milho leva de 38 a 45 horas, enquanto a cana de 10 a 12 horas, daí uma das vantagens em utilizá-la como base para a produção em larga escala do combustível (BNDES; CGEE, 2008; NOVA CANA, 2017).

Considerando a melhor quantidade obtida pela preparação Cellic CTec2, cerca de 138 litros de etanol seriam produzidos por tonelada de papel cartão utilizada, um resultado bastante satisfatório para as condições analisadas.

5.4 CUSTO

Conforme enunciado anteriormente neste trabalho, o processo de produção de etanol de segunda geração ainda possui um valor bem elevado quando comparado ao processo usual, a partir da cana-de-açúcar. O uso de enzimas encarece a produção devido ao grande volume necessário a ser utilizado. No entanto, comparando-se com a produção a partir do bagaço e dos resíduos da cana-de-açúcar, o processo a partir da embalagem cartonada é ainda mais barato por não possuir a etapa de pré-tratamento do material.

O valor aproximado de 50 mL da enzima Cellic CTec2 é de R\$545,00. Baseando-se nas condições em que houve maior produção do etanol – 0,218 g - pode-se estimar que os gastos apenas com o complexo enzimático para o beneficiamento das 2 g de papel cartão seriam de R\$ 6,54. Analogamente, para produção de um litro de etanol seriam gastos mais de R\$ 2000,00 apenas com a degradação do material. É um custo muito alto para um produto que é produzido e consumido em grandes quantidades como o etanol combustível. Daí a necessidade de se otimizar o processo a fim de maximizar os lucros com a produção. De acordo com o observado durante a execução deste trabalho, algumas sugestões foram levantadas como possíveis melhorias para o processo:

- padronização da granulometria do papel cartão, transformando-o em um material mais uniforme, aumentando o contato entre a enzima e a superfície das partículas;
- garantia de homogeneidade da agitação que, como citado anteriormente, apresenta grande influencia sobre o processo de hidrólise enzimática;
- otimização da quantidade de enzima a ser utilizada;
- mistura de complexos enzimáticos a fim de diminuir a quantidade utilizada do que possui mais alto valor, barateando o valor final, principalmente se o adicionado apresentar um custo menor;
- parcerias com empresas produtoras destes complexos a fim de baratear o valor de compra.

5.5 CONTRIBUIÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nas dificuldades encontradas ao longo do desenvolvimento dos experimentos, algumas contribuições podem ser feitas para trabalhos futuros nesta área de pesquisa. Uma das principais dificuldades foi o acesso aos equipamentos, muito requisitados pelos estudantes da UTFPR. Dessa forma, o desenvolvimento de alguns deles pode ser comprometido de alguma forma, como no caso da Incubadora *Shaker*, em que sua homogeneização pode não ter sido tão eficiente. A ausência de um equipamento para trituração do papel cartão acabou gerando um material com granulometria muito variada, o que não seria o ideal para o processo, dificultando a adsorção da preparação enzimática ao substrato. O papel cartão é um material resistente, que mesmo em presença de bastante água ofereceu oposição ao processo de trituração utilizando o liquidificador. Outro ponto a se destacar é a própria composição do papel, que teoricamente deveria ser composto apenas por celulose, mas não se pode garantir que nenhum outro componente foi incorporado à massa durante seu processo de fabricação.

6 CONCLUSÃO

Da elaboração e do desenvolvimento deste Trabalho de Conclusão de Curso, pode-se concluir que a embalagem cartonada longa vida é uma matéria-prima para produção de etanol, principalmente se manuseada nas devidas condições de tempo, materiais e equipamentos disponíveis.

Dentre os complexos enzimáticos utilizados, o que promoveu maior produção do produto desejado foi o Cellic CTec2 provavelmente pelo fato de ser uma enzima desenvolvida mais recentemente, com uma maior qualidade quando comparada a outra. Além disso, possui uma maior quantidade de celulases para hidrólise quando comparada ao Cellic HTec2, a qual possui uma maior capacidade de hidrólise de hemiceluloses e é geralmente utilizada em conjunto com outros complexos.

Uma vez detectado pelo método de quantificação de etanol – Cromatografia Gasosa - afirma-se que houve a formação do produto, como desejado desde o início do trabalho, e que pode ser utilizado como combustível após um processo de destilação fracionada para separação deste componente.

O custo da produção de etanol por este método é mais alto do que pelos meios tradicionais, a partir da fermentação da cana-de-açúcar, mas pode ser reduzido se o processo for otimizado em vários pontos: melhora na qualificação da matéria-prima, evitando uma granulometria tão variada entre o papel cartão após ser triturado; confiabilidade na homogeneização da mistura entre matéria-prima, enzima, levedura e água, em conjunto com a concentração adequada da enzima, para que esta seja suficiente e atinja todos os pontos da amostra; parcerias com empresas produtoras dessas enzimas, dentre outras ações. Porém, comparando-se com a produção a partir dos resíduos da cana-de-açúcar, este processo ainda é mais viável por possuir uma etapa a menos, já que o pré-tratamento do material é aqui dispensável, além de proporcionar a produção do produto final desejado a partir de um resíduo tão comum e que é gerado em grandes quantidades.

Vale ressaltar que o processo de produção de etanol a partir de embalagem cartonada longa vida em escala laboratorial pode ser incrementado, principalmente

se houver mais tempo disponível para a elaboração de inúmeros testes, com uma exclusividade de uso dos equipamentos e disponibilidade de materiais, desenvolvendo-se um projeto de iniciação científica sobre o assunto. Para trabalhos futuros, seria interessante o desenvolvimento de análises utilizando outros tipos de enzimas, em concentrações mais variadas, para se ter um comportamento mais completo acerca dos processos de degradação e fermentação.

REFERÊNCIAS

- BARROS, T. D. Etanol lignocelulósico. **AGEITEC - Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000g63ym1ge02wx5ok0o71pxtm0b852y.html>>. Acesso em: maio 2016.
- BEZERRA, F. Bagaço da cana também produz álcool. **Instituto Ciência Hoje**, 2007. Disponível em: <http://www.cienciahoje.org.br/noticia/v/ler/id/2379/n/bagaco_da_cana_tambem_produz_alcool>. Acesso em: maio 2016.
- BRAHMACHARI, G. **Biotechnology of Microbial Enzymes: production, biocatalysis and industrial applications**. 1. ed. London: Elsevier, 2017.
- BNDES E CGEE - BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO E CENTRO DE GESTÃO E RECURSOS ESTRATÉGICOS. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. 1ª. ed. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.
- BONOMI, A.; MAIORANO, A. E.; RODRIGUES, M. F. D. A. Técnica aproveita lignocelulose de cana para produzir etanol. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 8, p. 29-33, jan./jun. 2008. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/VA08-pesquisa03.pdf>>. Acesso em: maio de 2016.
- CARVALHO, L. C. et al. Cana-de-açúcar e álcool combustível: histórico, sustentabilidade e segurança energética. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Goiânia, 9, n. 16, 1 jul. 2013. 530-543. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013a/agrarias/cana-de-acucar.pdf>>. Acesso em: abr. 2016.
- CARVALHO, M. L. **Estudo Cinético da Hidrólise Enzimática de Celulose de Bagaço de Cana-de-Açúcar**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, 2011.
- CEMPRE - COMPROMISSO EMPRESARIAL PARA A RECICLAGEM. Embalagens longa vida. **CEMPRE - Compromisso Empresarial Para A Reciclagem**. Disponível em: <<http://cempre.org.br/artigo-publicacao/ficha-tecnica/id/9/embalagens-longa-vida>>. Acesso em: maio 2016.

CGEE - CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS TECNOLÓGICOS. **Bioetanol combustível**: uma oportunidade para o Brasil. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2009.

CHIES, V. Etanol 2G depende do aprimoramento de enzimas. **EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1917538/etanol-2g-depende-do-aprimoramento-de-enzimas>>. Acesso em: maio 2016.

CNI - CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA. **Matriz energética e emissão de gases de efeito estufa**: fatos sobre o Brasil. Brasília: CNI, 2008. 34 p. Disponível em: <http://arquivos.portaldaindustria.com.br/app/conteudo_18/2012/08/16/1409/20120822123924998922a.pdf>. Acesso em: maio de 2016.

CNPEM - CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM ENERGIA E MATERIAIS. A produção do bioetanol ou etanol de 2ª geração. **CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais**, 2014. Disponível em: <<http://cnpem.br/a-producao-do-bioetanol-ou-o-etanol-de-2a-geracao/>>. Acesso em: maio 2016.

CURIOSIDADES sobre o etanol. **SITE DA NOVA CANA**. Disponível em: <<https://www.novacana.com/etanol/curiosidades/>>. Acesso em: abril de 2017.

DAMASO, M. C. T.; COURI, S. Fermentação. **AGEITEC - Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CON T000fid5sgif02wyiv80z4s4737dnfr3b.html>. Acesso em: maio 2016.

FERREIRA, M. E. da S. **Estudo da viabilidade da produção de etanol a partir de celulose**. 2014. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Química Industrial. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2014.

LEITE, R. C.; CORTEZ, L. A. B. O etanol combustível no Brasil. In: SWARZAC, A. **Biocombustíveis no Brasil**: realidade e perspectivas. Brasília: Ministério das Relações Exteriores, 2008. p. 60-75. Disponível em: <http://ag20.cnptia.embrapa.br/Repositorio/etanol3_000g7gq2cz702wx5ok0wtedt3xdr mftk.pdf>. Acesso em: abr. de 2016;

LUCARINI, A. C. et al.. Estudo da Hidrólise Enzimática da Palha da Cana de Açúcar para Produção de Etanol de Segunda Geração. **The Journal Of Engineering and Exact Sciences - JCEC**. Viçosa (MG), v. 03, n. 02, p. 1-12, 2017.

LOSEKANN, L.; VILELA, T.. Estimação da frota brasileira de automóveis flex e a nova dinâmica do consumo de etanol no Brasil a partir de 2003. **Blog Infopetro**, 2010. Disponível em: <<https://infopetro.wordpress.com/2010/07/26/estimacao-da-frota-brasileira-de-automoveis-flex-e-a-nova-dinamica-do-consumo-de-etanol-no-brasil-a-partir-de-2003/>>. Acesso em: maio 2016.

MACEDO, Isaias de C. **Doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e a sua sustentabilidade**. 2ª edição. ed. São Paulo: Berlendis & Vertecchia : UNICA – União da Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo, 2005. p. 101-104.

MATÉRIAS-PRIMAS do etanol de 2ª geração. **SITE DA NOVA CANA**. Disponível em: <<https://www.novacana.com/etanol/materias-primas/>>. Acesso em: abril de 2017.

MME - MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Resenha Energética Brasileira**. Exercício de 2015. Ministério de Minas e Energia. Brasília, p. 4. 2016.

NASCIMENTO, R. M. D. M. et al. Embalagem Cartonada Longa Vida: Lixo ou Luxo? **Química Nova na Escola**, n. 25, p. 1-7, maio 2007. Disponível em <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc25/qs01.pdf>>. Acesso em: maio de 2016.

NUNES, R. D. M. et al.. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 135-149, jul./dez. 2013. ISSN 2178-8820. Disponível em <[http://www.liberato.com.br/sites/default/files/arquivos/Revista_SIER/v.%2014,%20n.%2022%20\(2013\)/03.res%EDduos%20agroindustriais.pdf](http://www.liberato.com.br/sites/default/files/arquivos/Revista_SIER/v.%2014,%20n.%2022%20(2013)/03.res%EDduos%20agroindustriais.pdf)>. Acesso em: maio de 2016.

PACHECO, T. F. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? **Circular Técnica (INFOTECA-E)**, Brasília, 20 abr. 2011. 6 p. Disponível em

<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/886571/1/CITE04.pdf>>. Acesso em: maio de 2016.

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

PROCESSOS de fabricação do etanol. **Site da NOVA CANA**. Disponível em: <<https://www.novacana.com/etanol/fabricacao/>>. Acesso em: maio 2016.

ROSA, I. Z. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**. 2014. 78 f. Dissertação (Pós-graduação em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2014. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/110639/000790107.pdf?sequenc e=1>>. Acesso em: maio de 2016.

ROSA, S. E. S. D.; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, n. 32, p. 117-156, dez. 2009. Disponível em: <http://www.bndespar.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/revista/rev3204.pdf>. Acesso em: maio de 2016.

SWARZAC, A. 10 anos de veículos flex: pausa para reflexão. **UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar**, abr. 2013. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/colunas/21375871920322737930/10-anos-de-veiculos-flex-por-cento3A-pausa-para-reflexao/>>. Acesso em: maio 2016.

TETRA PAK. História da Tetra Pak. **Tetra Pak**. Disponível em: <<http://www.tetrapak.com/br/about/history>>. Acesso em: maio 2016a.

TETRA PAK. Material da embalagem. **Tetra Pak**. Disponível em: <<http://www.tetrapak.com/br/packaging/materials>>. Acesso em: maio 2016b.

UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Brasil poderá quase dobrar exportações de etanol para o Japão. **UNICA - União da Indústria de Cana-**

de-açúcar, São Paulo, 1 fev. 2011. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/15371114920338419546/brasil-podera-quase-dobrar-exportacoes-de-etanol-para-o-japao/>>. Acesso em: maio 2016.

VÁSQUEZ, 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 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007. Disponível em <<http://tpqb.eq.ufrj.br/download/hidrolise-enzimatica-e-fermentacao-simultaneas-para-producao-de-etanol.pdf>>. Acesso em maio de 2016.

VIEGAS, T. Competitividade internacional do etanol brasileiro: oportunidades e ameaças. **Blog Infopetro**, 13 dez. 2010. Disponível em: <<https://infopetro.wordpress.com/2010/12/13/competitividade-internacional-do-etanol-brasileiro-oportunidades-e-ameacas/>>. Acesso em: maio 2016.

ZABOTTI, C. **Parâmetros de Hidrólise Enzimática de Farelo de Arroz para Produção de Etanol de Segunda Geração**. 2014. 69 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2014.

ZANCHETTA, A. **Celulases e suas aplicações**. São José do Rio Preto, 2013. Disponível em <<http://www.rc.unesp.br/ib/ceis/mundoleveduras/2013/Celulases.pdf>>. Acesso em maio de 2016.