

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE AMBIENTAL
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

RENAN FREITAS SILVA

**CONVERSÃO ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS DERIVADOS DO
PROCESSAMENTO DO *Pinus elliotti* PARA OBTENÇÃO DE
BIOETANOL**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2014

RENAN FREITAS SILVA

**CONVERSÃO ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS DERIVADOS DO
PROCESSAMENTO DO *Pinus elliotti* PARA OBTENÇÃO DE
BIOETANOL**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Departamento Acadêmico de Ambiental (DAAMB) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), como requisito parcial para obtenção de título de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. José Hilton Bernardino de Araújo

CAMPO MOURÃO

2014



TERMO DE APROVAÇÃO

CONVERSÃO ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS DERIVADOS DO PROCESSAMENTO DO *Pinus elliotti* PARA OBTENÇÃO DE BIOETANOL

por

RENAN FREITAS SILVA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 11 de Dezembro de 2014 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof. Dr. José Hilton Bernardino de Araújo

Prof. Dr^a. Flávia Vieira da Silva Medeiros

Prof. Dr. Rafael Montanhini Soares de Oliveira

Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves

*"O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso de
Engenharia Ambiental"*

RESUMO

SILVA, R.F. **CONVERSÃO ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS DERIVADOS DO PROCESSAMENTO DO *Pinus elliotti* PARA OBTENÇÃO DE BIOETANOL.** 2014. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

Materiais lignocelulósicos contêm açúcares polimerizados, como celulose e hemiceluloses, que podem ser hidrolisados para facilitar sua fermentação por leveduras e obtenção de etanol. Este trabalho teve como objetivo a produção de bioetanol de segunda geração a partir de derivados do processamento do *Pinus elliotti* previamente tratados por via ácida para remoção da hemicelulose, tratamento básico para remoção da lignina, com ou sem aquecimento, à pressão normal ou a 1,2atm, seguido por conversão enzimática. Foram realizados dois experimentos para fins de comparação, $\Delta 1$ e $\Delta 2$. A biomassa deslignificada foi submetida a hidrólise enzimática, utilizando diversas enzimas comerciais: celulase, β -glucosidase, xilanases e hemicelulase. Após a conversão, o hidrolisado foi fermentado utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, depois destilado, e a concentração de etanol foi determinada por método crioscópico. No $\Delta 1$ a remoção de hemicelulose obteve uma média de extração em torno de 29%, enquanto no $\Delta 2$ a média ficou em 17%. Já na remoção de lignina o $\Delta 1$ apresentou menor percentual de remoção, quando comparado ao $\Delta 2$. O experimento $\Delta 1$ solubilizou cerca de 50% da massa da biomassa, já o $\Delta 2$ obteve um rendimento médio de 41%. Os melhores rendimentos de etanol foram obtidos no experimento $\Delta 1$, em que a biomassa foi submetida ao cozimento, com um rendimento médio de 2,7 g/L no experimento $\Delta 1$ e 1,7g/L para o experimento $\Delta 2$, apresentando rendimento satisfatórios quando comparado com outros trabalhos. Em termos de conversão da biomassa em etanol, os melhores resultados foram obtidos no experimento $\Delta 1$, com uma média de conversão de 0,20%. Já para o experimento $\Delta 2$, a conversão foi em média de 0,15%.

Palavras chaves: Bioetanol, resíduos de madeira, conversão enzimática, *Pinus elliotti*.

ABSTRACT

SILVA, R. F. **ENZYMATIC CONVERSION OF WASTE PROCESSING OF DERIVATIVES FOR OBTAINING *Pinus elliotti* BIOETHANOL.** 2014. 40 sheets. Final Project (Bachelor in Environmental Engineering) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

Polymerized sugars containing lignocellulosic materials, such as cellulose and hemicellulose, which can be hydrolyzed to facilitate their fermentation by yeast and production of ethanol. This study aimed to the production of second generation bioethanol from derivatives of *Pinus elliotti* previously treated by acid for removal of hemicellulose, basic treatment to remove the lignin, with or without heating at normal pressure or 1.2atm, followed by enzymatic conversion. Two experiments were conducted for comparison purposes, $\Delta 1$ and $\Delta 2$. The delignified biomass was subjected to enzymatic hydrolysis using various commercial enzymes: cellulase, β -glucosidase, xylanase and hemicellulase. After conversion, the hydrolyzate was fermented using *Saccharomyces cerevisiae*, distilled, and the ethanol concentration was determined by cryoscopic method. For $\Delta 1$ the removal of hemicellulose by extracting was 29%, while the average of $\Delta 2$ was 17%. For $\Delta 1$ the lignin removal showed lower when compared to $\Delta 2$. The experiment $\Delta 1$ solubilized about 50% of the biomass, and for the experiment $\Delta 2$ an average yield of 41%. The best ethanol yields were obtained in experiment $\Delta 1$, wherein the biomass is subjected to heating, with an average yield of 2.7 g/L and 1.7g/L to the experiment $\Delta 2$. In terms of biomass conversion to ethanol, the best results were obtained in experiment $\Delta 1$, with an average of 0.20% conversion. As for the $\Delta 2$ experiment, the conversion averaged 0.15 %.

Key words: Bioethanol, wood waste, enzymatic conversion, *Pinus elliotti*.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo de minha vida, e que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Em especial a minha família que sempre apoiaram minhas decisões, e me deram suporte durante esses anos.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela oportunidade de realizar o curso.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Hilton Bernardino de Araújo que através do seu conhecimento me auxiliou na realização deste e outros trabalhos e sempre esteve disponível a compartilhar experiências comigo. À minha ex-orientadora Prof^a Dr^a Maria Cleide Baldo por me guiar nos primeiros anos de pesquisa, sempre tão cuidadosa nas correções e ensinamentos.

Aos técnicos dos laboratórios de Ambiental (Kássia e Marcelo) e de Alimentos (Marcos) pelo apoio nos experimentos realizados neste trabalho. Agradeço também a Gabriela Meira pelo suporte no laboratório.

Aos professores Flávia, Maricir, Rafael, Sônia, Eudes, Cristiane e Maria Cristina que auxiliaram diretamente na execução deste trabalho, sempre a disposição para esclarecimentos. Aos demais professores do DAAMB, especialmente Paulo Agenor e Maristela, a quem possuo grande carinho. Aos demais professores que foram tão importantes na minha formação acadêmica.

Aos meus companheiros de república, Daniel, Henrique, Rafael, Paula, Tamyris, e Gigliolla que ao longo de tantos anos juntos acabaram por formar uma nova família.

Aos colegas do curso de Engenharia Ambiental, especialmente Lorene, Mateus Xavier, Amanda, Suzana, Henrique, Thayse, Mariana, Mateus Nogueira, Nathália e Jayson que estiveram comigo por todos esses anos e que irão continuar presentes na minha vida com certeza.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rotas tecnológicas para obtenção de etanol.	14
Figura 2 - Estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos.....	16
Figura 3 - (a) Hidrolisado com H ₂ SO ₄ (0,35% v/v) á 121°C e 1,2 atm. (b) Hidrolisado com H ₂ SO ₄ (0, 5% v/v) á temperatura ambiente. (c) Hidrolisado com NaOH (4 % p/v)..	31
Figura 4 – Média de extração de hemicelulose no pré-tratamento com H ₂ SO ₄ , com e sem cozimento (PT1 e PT2).
Figura 5 – Média de extração de lignina no pré-tratamento com NaOH	32
Figura 6 – Percentual de remoção de hemicelulose e lignina nos experimentos.	34
Figura 7 – Massa da biomassa solubilizada após os pré-tratamentos com H ₂ SO ₄ e NaOH.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Emissões de CO ₂ evitadas pelo uso de etanol da cana-de-açúcar produzida no Brasil.....	15
Tabela 2 – Procedimento de deslignificação da biomassa.....	26
Tabela 3 – Características das enzimas e doses recomendadas.	28
Tabela 4 – Tratamento enzimático realizado.....	29
Tabela 5 – Extração de hemiceluloses (tratamento com H ₂ SO ₄) e lignina (tratamento com NaOH) da biomassa.....	31
Tabela 6 – Temperatura, tempo e concentração de H ₂ SO ₄ e NaOH utilizados nos ensaios e massa extraída de hemicelulose e lignina da biomassa.	33
Tabela 7 – Concentração de e rendimento de etanol nos experimentos	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS.....	13
3.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	16
3.2.1 Celulose.....	17
3.2.2 Hemicelulose	18
3.2.3 Lignina	19
3.2.4 Outros Compostos.....	20
3.3 PRÉ – TRATAMENTO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	20
3.4 CONVERSÃO ENZIMÁTICA	21
3.5 CULTURA DO <i>Pinus Elliottii</i>	22
3.6 PRODUÇÃO COMERCIAL DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO ...	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 MATERIAIS.....	26
4.2 MÉTODOS.....	26
4.2.1 Pré – Tratamento do material lignocelulósico	26
4.2.1.1 Pré – Tratamento segundo Sassner et. al. ($\Delta 1$).....	27
4.2.1.2 Pré – Tratamento segundo Carvalho et. al. ($\Delta 2$)	27
4.2.2. Extração de Lignina	27
4.2.2 Preparação da solução tampão de McIlvaine	28
4.2.5 Hidrólise enzimática	29
4.2.6 Determinação do teor de etanol.....	32
4.2.7 Análise Estatística.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos tempos, a preocupação mundial com o problema do aquecimento global causado pelo excesso de Dióxido de Carbono (CO₂) advindo principalmente da queima de combustíveis fósseis, vem aumentando. A utilização de combustíveis fósseis é um dos principais fatores com influências negativas no equilíbrio ambiental, sendo que a sua utilização deve ser condicionada, para que não sejam atingidos altos índices de poluição nas áreas urbanas (SANTOS, 2008). Nesse contexto, os biocombustíveis como o etanol e o biodiesel surgem como opções ambientalmente viáveis, contribuindo com a diminuição da poluição atmosférica.

O etanol é uma das melhores alternativas ao uso de aditivos na gasolina, a qual apresenta alta toxidez, levando a uma combustão mais limpa ao final do processo. Sendo assim, tornam-se necessárias pesquisas para novas formas de obtenção deste produto. O etanol pode ser obtido através da biomassa açucarada (cana-de-açúcar, beterraba), biomassa amilácea (milho, trigo, mandioca, etc.) e biomassa celulósica (resíduos da indústria madeireira e de papel, entre outros) (PEDRO, 2013).

Conforme Silva (2010) a biomassa lignocelulósica pode ser convertida em etanol por via físico-química ou biológica. A via química é a mais utilizada, no entanto, é a que mais utiliza recursos financeiros, além de produzir efluentes indesejáveis. Com isso a conversão enzimática surge como uma alternativa viável ambientalmente e economicamente.

A conversão de compostos lignocelulósicos a etanol é dividida em dois principais processos: a hidrólise da celulose para produzir açúcares simples, e a fermentação destes por via microbiológica a etanol (BARBOSA, 2011). A hidrólise é usualmente catalisada pelas enzimas celulases, e a fermentação realizada por leveduras e bactérias. De acordo com Nascimento (2011) os fatores que afetam a hidrólise da celulose incluem a porosidade (área de superfície acessível) do material lignocelulósico, cristalinidade da fibra de celulose, e o conteúdo de hemicelulose. O conteúdo de hemicelulose e lignina dificulta o acesso da celulase à celulose, diminuindo a eficiência da hidrólise, efeito tal que pode ser minimizado pela remoção daqueles componentes, pela

redução da cristalinidade e pelo aumento da porosidade em processos de pré-tratamentos do material do qual se quer obter etanol (SILVA, 2009).

Os pré-tratamentos dos materiais lignocelulósicos para produção de etanol, podem ser por métodos físicos, físico-químicos, e biológicos. Esses métodos devem seguir os seguintes requerimentos: promover a formação de açúcares ou dar condições para sua formação por hidrólise enzimática após o pré-tratamento; evitar a degradação ou perda do teor de carboidratos; evitar a formação de bioprodutos inibidores do processo de hidrólise enzimática e fermentação; e ser economicamente viável (CHEMMÉS et. al., 2013).

Para as celulasas, enzimas envolvidas na hidrólise enzimática de biomassas de origem vegetal, ainda está reservada uma função de grande importância biotecnológica, a qual deverá utilizar anualmente muitas toneladas destas enzimas. Trata-se da hidrólise de biomassa vegetal presente em resíduos lignocelulósicos da agricultura, com a finalidade de obter xaropes de açúcares fermentescíveis. Esta aplicação é de grande importância para os países de base agroindustrial, visto que poderiam aumentar o rendimento econômico de suas culturas, sem a expansão da área plantada (ZANCHETTA, 2013).

É importante salientar que existem outros tipos de resíduos com potencial para conversão a etanol ou outras substâncias de interesse comercial e industrial, tais como cascas de cereais, etc. A biomassa derivada de materiais lignocelulósicos que são descartados na natureza pode ser utilizada como fonte de obtenção de etanol, evitando a utilização de áreas agriculturáveis para produção do álcool em larga escala. A utilização de resíduos lignocelulósicos, principalmente os agroindustriais, deve ser mais uma rota para obtenção da maior quantidade de etanol necessário para suprir a demanda internacional por esse biocombustível (PEDRO, 2013).

Este trabalho teve como objetivo a produção de bioetanol de segunda geração a partir de derivados do processamento do *Pinus elliotti* previamente tratados por via ácida e básica, seguido por conversão enzimática.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo principal a produção de bioetanol de segunda geração a partir de derivados do processamento do *Pinus elliottii* previamente tratados por via ácida e básica, seguido por conversão enzimática.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o uso de pré-tratamentos ácidos na remoção de hemicelulose e lignina de serragem;
- Determinar o uso de pré-tratamentos alcalinos na remoção de hemicelulose e lignina de serragem;
- Comparar parâmetros físico-químicos que influenciam no rendimento de extração de hemiceluloses e lignina do *Pinus elliottii*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

De acordo com Santos (2008) e Silva (2009), o termo biocombustível refere-se aos combustíveis líquidos ou gasosos do setor de transporte, que são predominantemente produzidos da biomassa vegetal. Dentre os principais combustíveis produzidos a partir destes recursos naturais pode-se destacar o etanol (combustível líquido), o hidrogênio e o metano (combustíveis gasosos).

Nesse contexto surgem o etanol e o biodiesel como opções viáveis. O etanol, produzido no Brasil a partir da cana-de-açúcar, é o exemplo de maior êxito dentre os biocombustíveis, sendo utilizado por grande parte da frota de veículos automotores, de maneira pura ou misturada à gasolina. Contudo, o aumento da demanda por esse combustível de origem vegetal, além de seu apelo ambiental, fez com que se procure aperfeiçoar e aumentar as possibilidades de produção do etanol. É nesse ponto que surge o etanol celulósico (LIMA, 2009). Uma matéria-prima em potencial para uma boa relação custo-benefício na produção de etanol é o material lignocelulósico, o qual é acessível e de baixo custo por ser um resíduo de vários processos (FUENTES et al., 2007).

Santos (2008) afirma que os biocombustíveis não podem, na prática, substituir os combustíveis fósseis (gasolina, diesel, etc), pois necessitaria de grandes áreas de produção, o que implicaria na redução da área agrícola, fundamental para a produção de matéria-prima para a produção de alimentos, que aumenta à medida que a população vai aumentando, porém nenhum país poderá fomentar o uso de biocombustíveis com o objetivo de substituir os combustíveis fósseis, mas sim a adição aos combustíveis fósseis, para se diminuir a dependência dos países produtores e os impactos ambientais gerados.

3.1.1 Bioetanol

O bioetanol é produzido a partir de biomassa ou da fração biodegradável de resíduos, para utilização como biocombustível. O etanol é, numa definição simples, um álcool incolor, volátil, inflamável e totalmente solúvel em água, produzido por meio da fermentação da sacarose, comercialmente conhecido como álcool etílico, apresenta fórmula molecular C_2H_6O podendo ser obtida por três maneiras gerais: por via destilatória, por via sintética e por via fermentativa (SANTOS, 2008; POLOBIO, 2009; SILVA, 2009).

Em 1975, com o lançamento do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), a percentagem de álcool anidro (100% °GL (Graus Gay-Lussac)) misturado à gasolina aumentou significativamente e o álcool etílico hidratado (entre 93,2 °GL e 93,8 °GL) passou a ser utilizado em veículos cujos motores foram especialmente desenvolvidos para esse combustível. Segundo a Empresa de Pesquisa Energética, desde o lançamento deste programa a produção de álcool no país aumentou de 700 milhões de litros, em 1975, para 23,64 bilhões de litros na safra 2012/13 e é estimada em 27,17 bilhões de litros para 2013/14, um incremento de 3,53 bilhões de litros, alta de 14,94%.

Os biocombustíveis utilizados no Brasil, são na sua maioria, considerados de 1ª geração, ou seja, biocombustíveis produzidos a partir de culturas amiláceas (trigo, milho, etc), de culturas oleaginosas (soja, girassol, etc) ou de culturas açucareiras (cana-de-açúcar beterraba sacarina). Em outras palavras o etanol de primeira geração é aquele produzido a partir da fermentação de açúcares pelo processo de sacarose, sem que haja a necessidade de liberação de açúcares como é o caso do etanol de segunda geração. O etanol 2G é considerado um combustível de segunda geração devido ao processo de obtenção do produto ser diferente, necessitando de mais etapas para sua produção (PEDRO, 2013).

Há três etapas principais no processo de conversão dos materiais lignocelulósicos em etanol, primeiro há a necessidade de um pré-tratamento para remoção de compostos lignocelulósicos para posterior sacarificação enzimática da biomassa vegetal para disponibilizar os açúcares fermentáveis; a segunda etapa consiste na fermentação dos açúcares liberados realizada por

microrganismos especializados (esta etapa pode ser realizada em uma etapa combinada chamada de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF)); e a terceira etapa sendo a recuperação do etanol pelo processo de destilação (SILVA, 2009). A Figura 1 expõe os meios e fontes de obtenção de etanol.

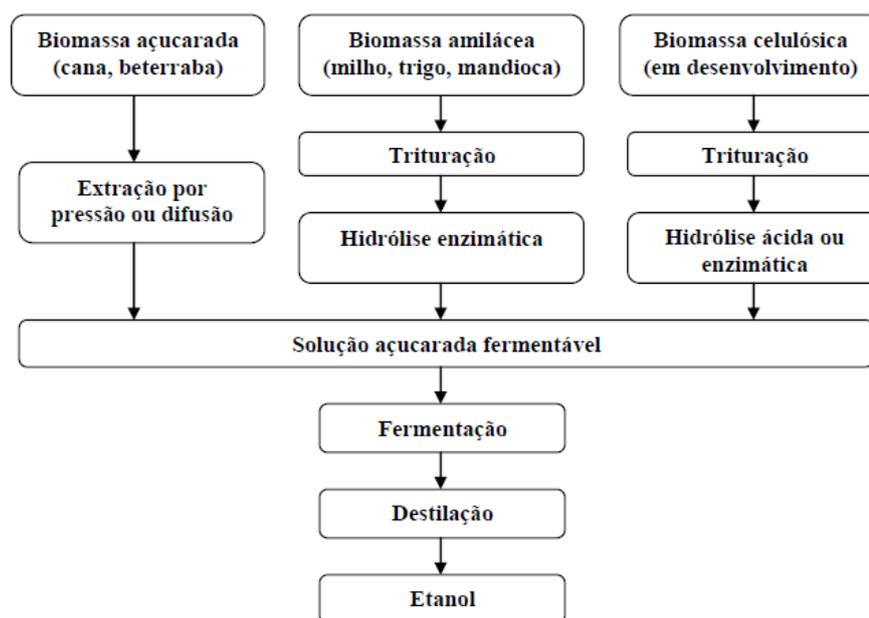


Figura 1 – Rotas tecnológicas para obtenção de etanol

Fonte: Silva, 2009.

Para garantir a sustentabilidade dos recursos naturais, desenvolveu-se nos últimos anos uma nova gama de biocombustíveis denominados de 2ª geração, obtidos a partir de biomassa lignocelulósica. O etanol de segunda geração consiste no aproveitamento dos subprodutos da produção de álcool e açúcar denominados de primeira geração. A produção de biocombustíveis de 2ª geração gera como produto o etanol celulósico obtido por processos bioquímicos, através da conversão da celulose e hemiceluloses presentes na biomassa em etanol (SIMS et al., 2008; NASCIMENTO, 2011; BARBOSA, 2011; BALAT, 2011; PEDRO, 2013).

O bioetanol de segunda geração vem sendo produzido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos desde o fim do século XIX, mas somente nos últimos 25 anos essa tecnologia tem sido proposta para atender o mercado de combustíveis. Os principais programas de pesquisa e

desenvolvimento são conduzidos nos Estados Unidos e na Europa, basicamente em escalas experimentais de produção, mas seu sucesso poderia transformar o bioetanol em um biocombustível passível de ser produzido em quase todas as regiões do mundo, aproveitando a alta disponibilidade de resíduos orgânicos de diversas fontes (SILVA, 2010).

O etanol contém \pm 35% de oxigênio na sua composição e permite uma combustão limpa, ou seja, da sua queima resulta formação de H_2O e CO_2 , além de calor (sem resíduos carbonosos), além da emissão de CO_2 ser considerada baixa quando comparados a outros combustíveis (SANTOS, 2008).

Um estudo conduzido pela Embrapa Agrobiologia (2009), comprovou que o Etanol produzido a partir da cana-de-açúcar é capaz de reduzir em até 73% as emissões de Dióxido de Carbono na atmosfera – se usado em substituição à gasolina. Na Tabela 1 é exposta a produção de Gases de Efeito Estufa (GEE's), em especial o CO_2 , por automóvel (S10 cabine simples) com motores de potência semelhante que rodam com diesel, gasolina pura, gasolina brasileira (com adição de 23% de etanol) e etanol puro de cana-de-açúcar.

Tabela 1 – Produção de Gases de Efeito Estufa (GEE's), em especial o CO_2 , por automóvel (S10 cabine simples) e por tipo de combustível.

Modelo	Motor	Combustível	Rendimento (km/L)	Emissões CO_2 (kg)
S10 cabine simples	2.8 turbo	Diesel	13,5	29,69
S10 cabine simples	2.4 flexpower	Gasolina pura	10,4	35,10
S10 cabine simples	2.4 flexpower	Gasolina brasileira	9,5	28,62
S10 cabine simples	2.4 flexpower	Etanol	7,2	6,92

Fonte: Embrapa Agrobiologia, 2009.

3.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Os materiais lignocelulósicos são polímeros de carboidratos complexos compostos, basicamente, por três substâncias: celulose ($C_6H_{10}O_5$)_x, hemicelulose ($C_5H_8O_4$)_m e lignina ($C_9H_{10}O_3(OCH_3)$)_n. Estes componentes

representam cerca de 90% da massa seca do material. Os 10% restantes consiste em extrativos e cinzas (BALAT, 2010; CHEMMÉS et. al., 2013).

A dificuldade de se converter os materiais lignocelulósicos em insumos químicos é atribuída às suas características químicas e morfológicas. Esses materiais são constituídos de fibras de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de polioses e lignina (SILVA, 2009). Em uma molécula de celulose pode haver mais de 15.000 unidades de glicose e as cadeias de celulose que se encontram agregadas paralelamente para formar as fibrilas elementares (Figura 2), que são insolúveis em água e apresentam regiões cristalinas e amorfas (FENGEL; WEGENER, 1989).

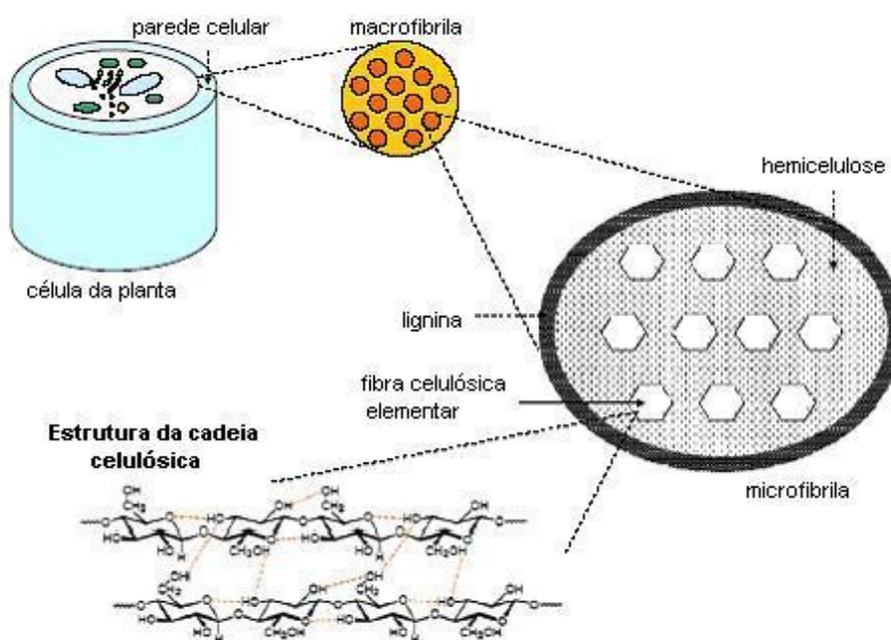


Figura 2 - Estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos

Fonte: ZHANG, 2008.

3.2.1 Celulose

A celulose é o composto orgânico mais comum na natureza. Ela constitui entre 40 e 50% de quase todas as plantas. Há estimativas de que cerca de 50 bilhões de toneladas deste composto químico são produzidas por ano. Ela está presente também em bactérias e algas, mas em pequenas proporções,

estando localizada principalmente na parede secundária das células vegetais (KLOCK et al., 2005).

A celulose é um polissacarídeo linear de estrutura cristalina. Trata-se de um homopolímero de unidades repetidas de glicose ligadas por β -1, 4 ligações glicosídicas (OGEDA & PETRI, 2010; SARKAR et. al., 2012; CHEMMÉS et. al., 2013). As cadeias de celulose são empacotadas em microfibrilas, que são estabilizadas por meio de ligações de hidrogênio. Em uma molécula de celulose pode haver mais de 15.000 unidades de glicose e as cadeias de celulose se encontram agregadas paralelamente para formar as fibrilas elementares, que são insolúveis em água e apresentam regiões cristalinas e amorfas (ZHANG, 2008; SILVA, 2009).

3.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolímero curto e muito ramificado formado principalmente por pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-glicose, D-manose, Dgalactose) e ácido glucurônico e manurônico (OGEDA & PETRI, 2010; SARKAR et. al., 2012; CHEMMÉS et. al., 2013) (Figura 3).

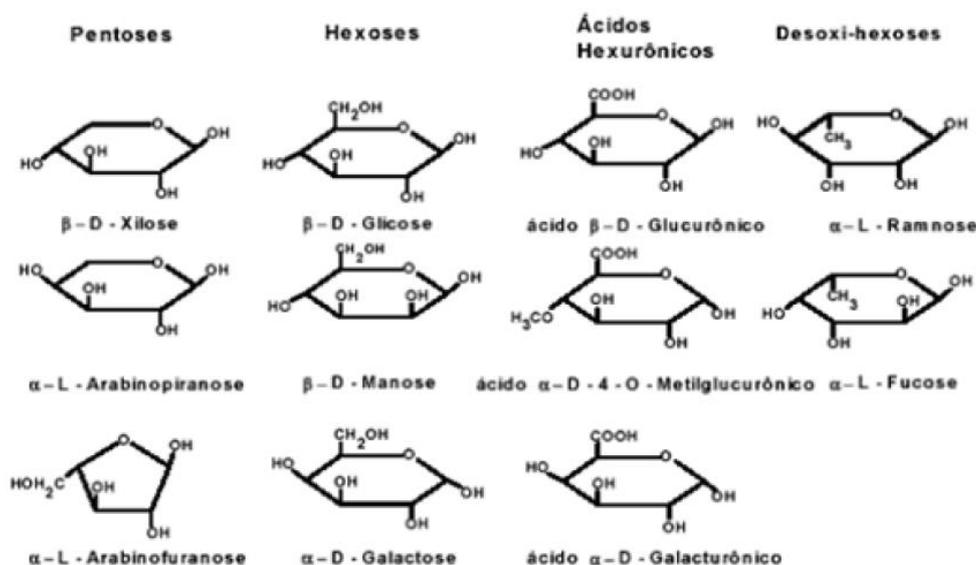


Figura 3 - Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses.

Fonte: Fengel & Wegener, (1989).

Algumas unidades de açúcares possuem cinco carbonos e outras seis, denominadas respectivamente de pentose e hexose que, quando condensadas, recebem o nome de pentosana e hexosana, com fórmula geral $(C_5H_8O_4)_n$ e $(C_6H_{10}O_5)_n$ respectivamente, onde n é o grau de polimerização. Uma pentosana quando hidrolisada leva apenas a unidades de xilose sendo denominada xilana e uma que leva unidades de arabinose, arabinana. Uma hexosana quando hidrolisada, dependendo da sua unidade pode ser chamada de manana ou galactana (D'ALMEIDA, 1981).

3.2.3 Lignina

A lignina é um polímero amorfo formado por redes tridimensionais compostas por unidades fenilpropano interligadas. Dentre suas características mais relevantes está a rigidez da parede celular da planta, sua tensão oxidativa e a resistência contra ataque microbiano, devido a sua natureza hidrofóbica (OGEDA & PETRI, 2010; SARKAR et. al., 2012; CHEMMÉS et. al., 2013).

A lignina provém da polimerização de hidrogenativa dos seguintes álcoois: álcool trans-coniferílico; álcool trans-sinapílico e álcool trans-paracumárico (Figura 4). Também podem possuir, em sua estrutura, ácidos carboxílicos aromáticos, na forma de éster (D'ALMEIDA, 1981).

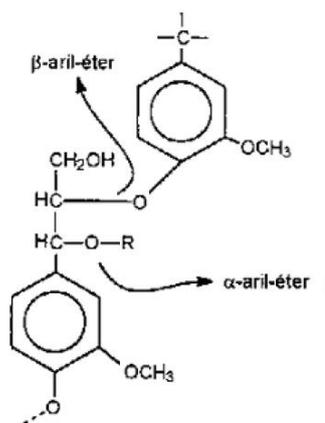


Figura 4 - Ligações α e β -aryl éter da macromolécula de lignina.

Fonte: Fengel & Wegener, (1989).

3.2.4 Outros Compostos

Os materiais lignocelulósicos podem conter também uma extensa variedade de extrativos orgânicos, os quais podem ser extraídos por solventes polares ou apolares. São exemplos de extrativos: ácidos graxos, ceras, alcalóides, proteínas, fenólicos, açúcares simples, pectinas, mucilagens, gomas, resinas, terpenos, amido, glicosídeos, saponinas e óleos essenciais (SILVA, 2009).

3.3 PRÉ – TRATAMENTO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

O processo mais desafiador na produção de combustível de segunda geração é o pré-tratamento da biomassa. Os métodos de pré-tratamento se referem à solubilização e a separação de um ou mais componentes dessa biomassa (CHEMMÉS et. al., 2013).

Devido à natureza cristalina da celulose, a barreira física formada por ligninas ao redor das fibras celulósicas e a presença de complexas interações entre hemicelulose e celulose presentes nas paredes celulares dos vegetais e entre estes polissacarídeos e ligninas, o pré-tratamento desse material representa uma etapa imprescindível na rota de produção, pois objetiva separar a matriz de lignina, reduzir a cristalinidade da celulose, aumentar a fração amorfa da mesma e solubilizar a hemicelulose, separando o hidrolisado da celulose para que o mesmo fique mais acessível às hidrólises biológicas e químicas (SARKAR et. al., 2012; CHEMMÉS et. al., 2013).

De acordo com a sua natureza, os pré-tratamentos podem ser classificados em: físicos, químicos, biológicos e físico-químicos (BARBOSA, 2011). Os pré-tratamentos físicos são aqueles que utilizam a moagem de impacto, aplicando forças de cisalhamento e de redução da cristalinidade da celulose. Este método possui o inconveniente de precisar de um elevado consumo energético. Os pré-tratamentos químicos tem como objetivo

solubilizar a fração de lignina e alterar a estrutura da celulose, facilitando a ação das enzimas. Os principais pré-tratamentos químicos são a oxidação úmida, o tratamento com ozônio, a hidrólise alcalina e o tratamento com solventes orgânicos (BARBOSA, 2011).

A etapa de pré-tratamento lignocelulósico já vem sendo estudada há muito tempo pela indústria de celulose e papel, que utiliza predominantemente o tratamento alcalino, conhecido como processo Kraft. Entretanto, o setor papelero não utiliza a celulose para fermentação, a geração de inibidores na etapa de pré-tratamento não é um problema, porém é um fator essencial para a fermentação do hidrolisado para a produção de etanol lignocelulósico. Assim, na última década, vários tipos de pré-tratamento vêm sendo estudados visando redução de custos e minimização de inibidores para a produção de bioetanol. As etapas seguintes como, hidrólise e fermentação, vêm se mostrando um grande desafio em termos de conversão (NASCIMENTO, 2011).

3.4 CONVERSÃO ENZIMÁTICA

Economicamente, as enzimas são metabólitos comerciais importantes, que podem ser produzidas a partir de microrganismos de diferentes gêneros e espécies. Estas enzimas possuem uma infinidade de utilidades no cotidiano, com uso em tecidos, alimentos, fármacos, tratamentos industriais e ambientais, entre outros.

As enzimas são proteínas sintetizadas em células vivas, possuindo assim, estruturas proteicas, as quais podem ser primárias, secundárias, terciárias ou ainda quaternárias, dependendo da atividade catalítica para qual são destinadas. A estrutura e o centro ativo enzimático são decorrentes de sua estrutura tridimensional, que podem ser afetados por agentes capazes de provocar alterações na proteína. Isso torna a atividade enzimática dependente das características do meio, principalmente o pH e a temperatura. Toda reação química catalisada por enzimas será afetada de acordo com a variação da temperatura. Quando a temperatura aumenta, a velocidade de reação

inicialmente aumenta, em virtude da energia cinética aumentada entre as moléculas e o substrato (MARZZOCO et al., 1999).

Do ponto de vista termodinâmico, uma enzima é um catalisador que acelera uma reação porque diminui sua energia de ativação, sendo que, quanto maior for a energia de ativação, mais lenta a reação ocorrerá. O aumento na velocidade da reação ocorre devido ao fato de a enzima aumentar o número de moléculas ativadas, ou seja, capazes de reagir (LEHNINGER, 1989).

Através do uso de enzimas, no caso a celulase, a celulose pode ser hidrolisada a glicose e a mesma pode ser utilizada para aumento da produção de etanol, bem como para a produção de insumos químicos como: etileno, buteno (dimerização de etileno), propileno (metastese de buteno com etileno), butadieno (via acetaldeído, processo da COPERBO) e ácido acrílico (via ácido láctico) (LEHNINGER, 1989).

Celulases são enzimas responsáveis pela degradação da celulose, principal composto presente nas células vegetais. No caso das celulases, três enzimas fazem parte desse grupo, elas recebem os nomes de endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. As endoglucanases agem na região interna da fibra de celulose e liberam compostos menores formados por poucas unidades de glicose, os chamados oligossacarídeos (açúcares pequenos). As exoglucanases agem nas extremidades das fibras de celulose e liberam unidades de glicose (livres) ou celobiose, que são compostos menores, formados por duas unidades de glicose. As β -glicosidases representam um grupo de enzimas com funções variadas e fazem parte da família das glicosil hidrolases e quebram a ligação química existente entre as duas unidades de glicose que formam a celobiose, liberando unidades de glicose (livres) (ZANCHETTA, 2013).

3.5 CULTURA DO *Pinus Elliottii*

Procurando utilizar economicamente as áreas que ocorrem no Estado de São Paulo, em 1936, o Serviço Florestal deste Estado iniciou a introdução de coníferas exóticas, principalmente com espécies de origem europeia. Em 1948

foi introduzido, do sudeste dos Estados Unidos, o *Pinus elliotti*. Entre 1955 e 1964, estabeleceram-se grandes programas de reflorestamento, baseados exclusivamente em *Pinus elliottii* e *Pinus taeda*, sendo que, até 1974, somente o serviço Florestal do Estado de São Paulo plantou 60.000.000 de árvores. O crescimento inicial rápido e uniforme e as facilidades de aquisição de sementes fizeram com que a maior parte das plantações fosse feita com *Pinus elliotti* (SUASSUNA, 1977).

O Pinus é uma espécie de plasticidade genética, isto é, apresenta capacidade de adaptação mesmo em ambientes diferentes dos de ocorrência natural. O Pinus tem um número muito grande de espécies, algumas originárias dos Estados Unidos, como é o caso do *Pinus elliotti*. Estas espécies estão plantadas em larga escala no sul do País, compreendendo os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e sul de São Paulo. O *Pinus elliottii* necessita de invernos frios com temperaturas mínimas de 0°C e não suporta períodos secos com déficit hídrico. Em termos taxonômicos, esta espécie é denominada *Pinus elliottii* var. *elliottii*. Existe outra espécie que é o *Pinus elliottii* var. *densa* muito pouco utilizada até agora. A dificuldade de se obter sementes é ainda um obstáculo à sua difusão. Em São Paulo, esta espécie tornou-se promissora em áreas de transição entre *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Pinus caribaea* var. *caribaea* (SUASSUNA, 1977).

Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (ABRAFF) em 2012 o Brasil possuía uma área de mais de 1,5 milhão de hectares plantadas de *Pinus elliotti*, sendo a região sul a que possui maior área plantada.

3. 6 PRODUÇÃO COMERCIAL DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

A produção do etanol a partir de materiais lignocelulósicos em escala comercial já é uma realidade nos dias de hoje, e tem sido amplamente estudadas a fim de viabilizar este processo.

A empresa IOGEN Corporation, localizada em Ottawa (Canadá), instalou uma unidade de demonstração de um processo de hidrólise catalisada por

enzimas, com capacidade para produzir até 7.600 litros por dia de etanol. A matéria-prima de partida é a palha de trigo, que é um resíduo remanescente dessa cultura. A produção comercial das enzimas é um dos pontos críticos que limitam a aplicabilidade desta tecnologia (IOGEN, 2014).

No Brasil o primeiro empreendimento que produzirá etanol de segunda geração, a partir de bagaço da cana-de-açúcar, está localizado no estado de Alagoas. A Bioflex 1, unidade industrial da GranBio, é a primeira fábrica de etanol celulósico em escala comercial do Hemisfério Sul. Instalada no município alagoano de São Miguel dos Campos, distante 55 quilômetros do porto de Maceió, a unidade entrou em operação em setembro de 2014. Tem capacidade para produzir 82 milhões de litros do biocombustível por ano. Um conjunto de tecnologias (pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação) permite a transformação de palha e bagaço de cana-de-açúcar em um biocombustível que não compete com alimentos, pois não é necessário plantar nenhum hectare a mais de cana-de-açúcar para produzi-lo. A matéria-prima utilizada no processo é composta apenas por resíduos, como a palha, que antes era descartada ou queimada nos canaviais (GRANBIO, 2014).

Já no caso dos resíduos da madeira a produção de etanol se tornaria atrativa em países com território menores e com condições climáticas não favoráveis as outras culturas lignocelulósicas. No Brasil o processamento de madeira é destinado a produção de toras, compensados, serragem, pellets, celulose, papel, etc. Os resíduos de serragem gerados poderiam ser facilmente hidrolisados e adicionado a outros mostos para produção de etanol, uma vez que o hidrolisado é rico em açúcares fermentescíveis.

Com isso milhares de toneladas de casca de madeira que são desperdiçadas durante seus processos, poderiam ser utilizadas para produção de etanol. Alguns trabalhos vem sendo desenvolvidos e que fazem parte de esforços de vários pesquisadores em investigar a viabilidade dessa matéria-prima na produção de etanol. A casca da madeira não concorre com a indústria alimentícia, não passa por períodos de entressafra e não é usada para a produção de celulose. Bragatto (2011) afirma que uma tonelada de cana produz cerca de 80L de etanol, enquanto a mesma medida de casca fresca de eucalipto produz 106L. Isso comprova que mais estudos sobre a

produção de etanol de segunda geração devem ser feitos, tendo como objetivo o maior rendimento possível do processo.

Almeida e Araújo (2012) afirmam que os custos de produção do etanol celulósico é superior aos demais, tendo um custo médio de US\$ 0,80. Mais que o dobro do que se gasta com o etanol a partir de amido (US\$ 0,35) e do etanol por sacarose (US\$ 0,27). O elevado custo do etanol celulósico se dá pelos custos com solventes químicos nos pré-tratamento de deslignificação da biomassa, além das enzimas utilizadas no processo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

- Material lignocelulósico: foi utilizada como substrato, a serragem do *Pinus Elliottii* obtida em uma madeireira no município de Campo Mourão – PR.
- Reagentes de hidrólise: para o desenvolvimento das reações de hidrólise da celulose foram utilizadas as enzimas comerciais NS50013 (celulase, lote CCN03102), NS50010 (β -glucosidase, lote DCN00209), NS50030 (xilanase, lote CDN00412), NS22002 (hemicelulase, lote cnn02193) e NS50012 (complexo multicomponentes, lote KTN02161) obtidas com a Novozymes, além de solução tampão de McIlvaine, leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, NaOH (99%) e H₂SO₄ (98%) obtidos no Laboratório de Resíduos da UTFPR câmpus Campo Mourão.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Pré – Tratamento do material lignocelulósico

A serragem foi triturada em moinho de facas do tipo Wiley para reduzir o tamanho das partículas, não ultrapassando uma granulometria de 0,075 mm. O material foi classificado em peneiras da serie Tyler.

O material classificado foi submetido inicialmente à extração de hemicelulose por hidrólise ácida, sendo utilizados dois pré-tratamentos para comparação ($\Delta 1$ e $\Delta 2$) (MACHADO, ZANGIROLAMI & ADRIANO, 2009). Os experimentos foram realizados em triplicata, cujos resultados foram avaliados em termos da massa perdida das amostras após cada pré-tratamento.

4.2.1.1 Pré – Tratamento segundo Sassner et. al. ($\Delta 1$)

No experimento $\Delta 1$, 225 mL de ácido sulfúrico a 0,35% (v/v) foram misturados a 50g de material seco. A mistura foi levada a autoclave por uma hora a 121°C e pressão de 1,2 atm. Após cozimento o resíduo foi lavado com abundância com água destilada até atingir o pH 5. Posteriormente a lavagem e filtração, o material foi levado à estufa por 12 horas a uma temperatura de 50°C. O material já seco era armazenado em geladeira com temperatura de 4°C (SASSNER et al., 2008).

4.2.1.2 Pré – Tratamento segundo Carvalho et. al. ($\Delta 2$)

O experimento $\Delta 2$ foi submetido somente à ação química, sem cozimento para fins de comparação. No $\Delta 2$ 50g de material seco permaneceu imerso em 500mL de ácido sulfúrico diluído 0,5 % (v/v) por 2 horas, sob agitação. Após esse período, os sólidos foram lavados em abundância com água destilada para remoção do excesso de ácido até o pH estiver neutro, secos a 50°C. O material já seco era armazenado em geladeira com temperatura de 4°C (CARVALHO et al., 2005).

4.2.2. Extração de Lignina

Para remoção da lignina da serragem foi utilizado o processo de deslignificação alcalina. Conforme Martins (2007), foi pesado 25 g do material sem hemicelulose já seco e adicionado a 500 mL de uma solução de NaOH a 4% (p/v). A mistura foi levada a autoclave por 30 minutos a 121°C e pressão de 1,2 atm.

Após cozimento o material foi lavado com água destilada até pH neutro. Depois da lavagem e filtração a biomassa foi seca em estufa a uma temperatura de 50 °C por 12 horas, até a umidade da biomassa estar em torno de 20%, como sugere Dowe (2008) para preservar a estrutura da celulose. Após secagem a biomassa foi armazenada em geladeira com temperatura de 4°C, conforme Carvalho et al., 2005.

O procedimento adotado é exposto pela Tabela 2 (MACHADO, ZANGIROLAMI & ADRIANO, 2009).

Tabela 2 – Procedimento de deslignificação da biomassa.

Experimento	Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	H ₂ SO ₄ (% v/v)	NaOH (% p/v)
Δ1	1	121	60	0,35	4
	2	121	60	0,35	4
	3	121	60	0,35	4
Δ2	4	25	120	0,5	4
	5	25	120	0,5	4
	6	25	120	0,5	4

A determinação do rendimento de deslignificação do resíduo foi realizada pela diferença de massa antes e após a secagem da massa deslignificada em estufa de circulação induzida a 50°C. Essa determinação é necessária para quantificar a proporção de enzimas necessárias para realização da hidrólise enzimática que devem obedecer às especificações da empresa fornecedora (*Novozymes Latin America Ltda*).

4.2.2 Preparação da solução tampão de McIlvaine

Para a preparação da solução tampão de McIlvaine, foram preparadas inicialmente duas soluções distintas, sendo uma de fosfato de sódio dibásico, e outra de ácido cítrico.

A solução aquosa de fosfato de sódio dibásico (Na₂PO₄) foi preparada na concentração de 0,05 M, para isso, foram dissolvidos 8,907g de Na₂PO₄ em 1 litro de água destilada. A solução aquosa de ácido cítrico (C₆H₈O₇) foi

preparada na concentração de 0,05 M, para isso foram necessários dissolver 10,504 g de $C_6H_8O_7$ em 1 litro de água destilada. As soluções foram misturadas até atingir pH 5.

4.2.5 Hidrólise enzimática

Os preparados enzimáticos usados na hidrólise do material lignocelulósico foram as enzimas celulase (NS50013) suplementada com β -glucosidase (NS50010). A celulase tem como função romper a estrutura da celulose do material pré-tratado (deslignificado) em celo-oligômeros e celobiose, enquanto a β -glucosidase deverá transformar a celobiose em glicose. De acordo com a fornecedora, *Novozymes Latin America Ltda*, a adição de β -glucosidase deve ser de aproximadamente de 5-10% (v/v) da quantidade de celulase para a completa hidrólise da celulose disponível. Dependendo das propriedades do método de alimentação e do tratamento prévio (nesse caso deslignificação com solução alcalina), uma combinação de celulase, β -glucosidase, xilanasas (NS50030), hemicelulase (NS22002) e complexo enzimático de carboidrase (NS50012) podem ser utilizados.

A descrição de cada complexo enzimático está especificada no Quadro1.

Quadro 1 - Descrição das enzimas da *Novozymes* utilizadas no processo.

Complexo Enzimático	Descrição
NS50013 (Complexo de Celulases)	Esta preparação de celulase catalisa a quebra de celulósico em glicose, celobiose, e polímeros de glicose de elevado peso molecular. Este complexo pode ser usado para redução da viscosidade ou elevar o rendimento de extração de vários produtos de origem vegetal.
NS50010 (β-glucosidase)	A β -glucosidase também conhecida como celobiase, hidrolisa e celubiose em glicose. A celobiose é um carboidrato que consiste de duas moléculas de D-glicose, ambas unidas por uma ligação β -1,4 glicosídica. A NS50010 pode ser usada para suplementar a NS50013 afim de elevar o rendimento dos açúcares fermentescíveis.
NS50012 (Complexo enzimático)	A NS50012 é um complexo multi-enzimático contendo uma ampla faixa de carbohidrase, incluindo arabinase, β -glucanase, celulase, m-celulase, pectinase e xilanase. A NS50012 pode quebrar as paredes celulares para extração de componentes úteis a partir de tecidos vegetais e podem ser utilizadas no processamento de materiais vegetais e cereais. Esta enzima tem a capacidade de liberar os materiais ligados e pode degradar uma variedade de polissacarídeos não amiláceos.
NS50030 (Xilanase)	A NS50030 é uma endo-xilanase purificada com uma alta especificidade para pentosanas solúveis. Podem ser usadas para liberar açúcares pentoses a partir de frações de biomassa de hemicelulose.
NS22002 (β-glucanase/xilanase)	A NS22002 contém uma mistura de enzimas beta-glucanase e xilanase. A β -glucanase e a xilanase são as duas principais enzimas ativas presentes nessa preparação enzimática, mais o produto também contém outras enzimas, incluindo celulase, hemicelulase e pentosanase.

Na Tabela 3 são listadas as características das enzimas e os parâmetros indicados para sua aplicação de acordo com o fornecedor. A dose sugerida das enzimas é baseada em peso percentual em relação à quantidade de biomassa (sólidos totais) em base seca.

Tabela 3 - Características das enzimas e doses recomendadas.

Enzimas	Densidade (g/mL)	pH	Temperatura °C	Dosagem² % p/p (ST)
NS50013 <i>Complexo Celulase</i>	1,2	4,5 - 6,5	45 - 50	2 - 6%
NS50010 <i>β-Glucosidade</i>	1,2	2,5 - 6,5	45 - 70	0,2 - 0,6%
NS50012 <i>Complexo Enzimático</i>	1,2	4,5 - 6,0	25 - 55	0,05 - 0,4%
NS50030 <i>Xilanase</i>	1,1	4,5 - 6,0	35 - 55	0,1 - 0,5%
NS22002 <i>Hemicelulase</i>	1,2	5,0 - 6,5	40 - 60	0,4 - 2%

Após a sequência de deslignificação, 15g de material deslignificado foi colocado em recipiente de vidro, contendo 600 mL de solução tampão de McIlvaine com pH corrigido para 5,0. Em seguida a solução foi aquecida em banho-maria até 45 °C.

Seguindo as recomendações do fabricante, 0,075mL do preparado enzimático NS50030, equivalente a 0,0825g, foram adicionados à solução já aquecida, a reação processou-se por 20 min. Em seguida, adicionou-se 0,3mL do preparado NS22002, equivalente a 0,36g. A solução permaneceu em aquecimento a 50 °C por 20 minutos. A terceira etapa do tratamento consistiu na adição de 0,06mL do preparado NS50012, equivalente a 0,072g. Essa solução permaneceu sob aquecimento a 55°C por 20min. Na quarta etapa do tratamento foi adicionado 0,9mL, equivalente a 1,08g das enzimas NS50013. A reação se processou em banho-maria por 30 min. em temperatura de 50°C. O último tratamento enzimático consistiu da adição de 0,09mL, equivalente a 0,108g do preparado enzimático NS50010. Essa reação se processou por 30 minutos sob aquecimento a 50°C. Na tabela 4 é exposto o resumo do procedimento adotado.

Tabela 4 – Tratamento enzimático realizado.

Sequência Enzimas	Tempo (min)	Temperatura °C	pH	Dosagem mL
NS50030 (<i>Xilanase</i>)	20	45	5,0	0,075
NS22002 <i>Hemicelulase</i>	20	50	5,0	0,3
NS50012 <i>Complexo Enzimático</i>	20	55	5,0	0,06
NS50013 <i>Complexo Celulase</i>	30	50	5,0	0,9
NS50010 <i>β-Glucosidade</i>	30	50	5,0	0,09

Após o processo enzimático, o pH do hidrolisado foi corrigido para 5,0 com solução tampão de McIlvaine, depois adicionou-se 7,5 g de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* diluída em água para proporcionar a fermentação alcoólica. Após um período de 72h, o mosto fermentado foi destilado para obtenção de etanol.

4.2.6 Determinação do teor de etanol

O teor alcoólico das amostras foi determinado pela técnica de Crioscopia (PLATA-OVIEDO, 2009), por meio do Crioscópio MC 5400. Com a equação da curva de calibração (Eq. 1), que relaciona o teor de etanol (% v/v) com o descenso do ponto de congelamento (MATOSO, 2013).

$$\% \text{ ETANOL (v/v)} = [(2,944467 \times \Delta t \text{ } ^\circ\text{H}) + 0,021435] \times r^2 \quad \text{Eq. 1}$$

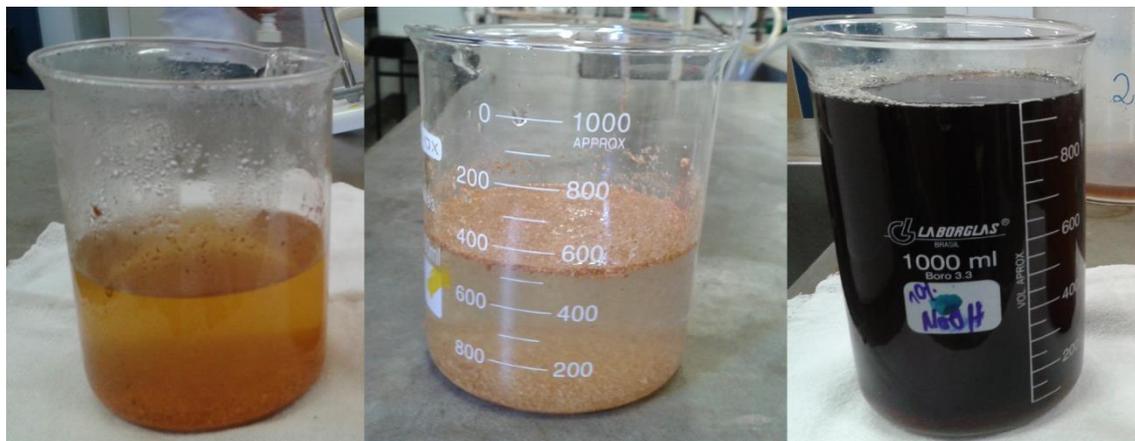
Onde: $\Delta t \text{ } ^\circ\text{H}$ é a diminuição do ponto de congelamento; $r^2 = 0,9989$ (fator de diluição da amostra).

4.2.7 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, pelo software livre BIOESTAT versão 5.3 para a comparação das médias entre os tratamentos, utilizando-se um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 5 ilustra as mudanças visuais ocorridas na biomassa após os pré-tratamentos.



(a)

(b)

(c)

Figura 5 – (a) Hidrolisado com H_2SO_4 (0,35% v/v) à 121°C e 1,2 atm. (b) Hidrolisado com H_2SO_4 (0, 5% v/v) à temperatura e pressão ambiente. (c) Hidrolisado com NaOH (4 % p/v).

A Figura 5a representa o resultado após tratamento com H_2SO_4 , com temperatura e pressão elevada, e a Figura 5b expõe o material após o tratamento com H_2SO_4 , em temperatura e pressão ambiente. Percebe-se que a coloração do hidrolisado após o tratamento com H_2SO_4 combinado com altas temperaturas e pressão apresentou tonalidade mais avermelhada, o que indica uma melhor extração dos compostos. A figura 5c apresenta o hidrolisado após tratamento para remoção da lignina com NaOH, onde a coloração escura se deve a presença de lignina, um dos principais responsáveis pela coloração na madeira. As perdas de massa após cada tratamento é exposto em percentagem na Tabela 5.

Tabela 5 – Extração percentual de hemiceluloses (tratamento com H_2SO_4) e lignina (tratamento com NaOH) da biomassa.

Experimento	Ensaio	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Celulose (%)
$\Delta 1$	1	28,8	23,4	47,8
	2	27,6	22,4	50,0
	3	29,6	18,3	52,1
$\Delta 2$	4	14,6	25,6	59,8
	5	17,4	24,8	57,8
	6	16,4	25,2	58,4

É importante salientar que o percentual de remoção de hemicelulose e de lignina pode ser influenciado pela remoção de outros compostos presentes na biomassa, pois não foram realizadas análises complementares para comprovar o percentual real de extração desses compostos.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 5 e Figura 4 pode-se constatar que o tratamento realizado com ácido, combinado com alta temperatura e pressão ($\Delta 1$) apresentou o melhor resultado de extração, se comparado com o tratamento realizado à temperatura e pressão ambiente ($\Delta 2$) (Figura 6).

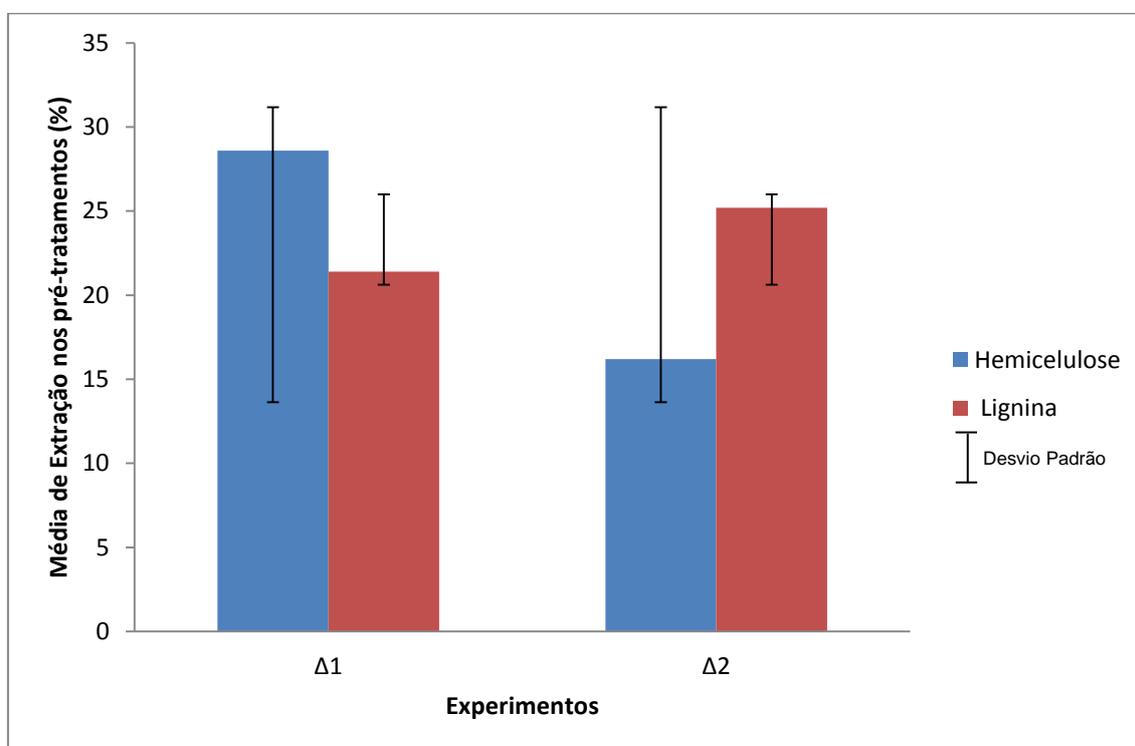


Figura 6 – Percentagem média de extração de hemicelulose e lignina no pré-tratamento com e sem cozimento ($\Delta 1$ e $\Delta 2$).

O objetivo deste estudo seria minimizar o gasto de energia no processo caso o resultado para o tratamento com e sem aquecimento fossem semelhantes, entretanto os resultados comprovam que, dentre os dois tratamentos, o mais efetivo é aquele com aquecimento a 121°C. Outra constatação interessante é que a perda de massa ocorre em ambas as etapas de pré-tratamento para a biomassa, sendo mais significativa na etapa de

hidrólise alcalina. Ressalta-se que a composição de celulose apresentada neste trabalho pode conter frações insolúveis de lignina e hemicelulose, cinzas e resíduos dos pré-tratamentos (CHEMMÉS et. al., 2013).

No $\Delta 1$ a remoção de hemicelulose foi superior à lignina, diferente do observado no $\Delta 2$, como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 – Temperatura, tempo e concentração de H_2SO_4 e NaOH utilizados nos ensaios e massa extraída de hemicelulose e lignina da biomassa.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	H_2SO_4 (% v/v)	NaOH (% p/v)	Hemicelulose (g)	Lignina (g)
1	121	60	0,35	4	14,4	5,8
2	121	60	0,35	4	13,8	5,6
3	121	60	0,35	4	14,8	4,6
4	25	120	0,5	4	7,3	6,4
5	25	120	0,5	4	8,7	6,2
6	25	120	0,5	4	8,2	6,3

Conforme observado na Tabela 6, a extração de hemiceluloses obtiveram melhores resultados no $\Delta 1$ (tratamento com aquecimento). A massa extraída da biomassa com H_2SO_4 obteve aproximadamente o dobro de remoção no $\Delta 1$, se comparado com o $\Delta 2$. Já a perda de massa no $\Delta 2$ foi superior ao $\Delta 1$ quando submetidos ao cozimento com NaOH.

De acordo com a análise estatística, os resultados obtidos na remoção de hemicelulose apresentaram uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre os dois tipos de tratamento, comprovando que o com H_2SO_4 torna-se mais eficiente quando submetido á altas temperaturas e pressões. Entretanto não há diferença significativa entre os tratamentos realizados com NaOH ($p > 0,01$). Uma explicação para este resultado pode ser atribuído à baixa extração de hemicelulose pelo tratamento da biomassa sem cozimento. Ao ser submetido ao cozimento, a hemicelulose presente na biomassa pode ter sido solubilizada juntamente com a lignina no processo de deslignificação (CHEN; HAN; XU, 2008). Conforme Oliveira (2009) o pré-tratamento com altas temperaturas promove a hidrólise dos polissacarídeos por auto-hidrólise, principalmente da hemicelulose a degradação parcial da lignina.

De acordo com Carvalho et. al. (2005), a partir da metodologia proposta é possível determinar as frações de Hemicelulose e lignina da biomassa

lignocelulósica. A Figura 7 ilustra o percentual de remoção de hemicelulose e lignina em todos os experimentos.

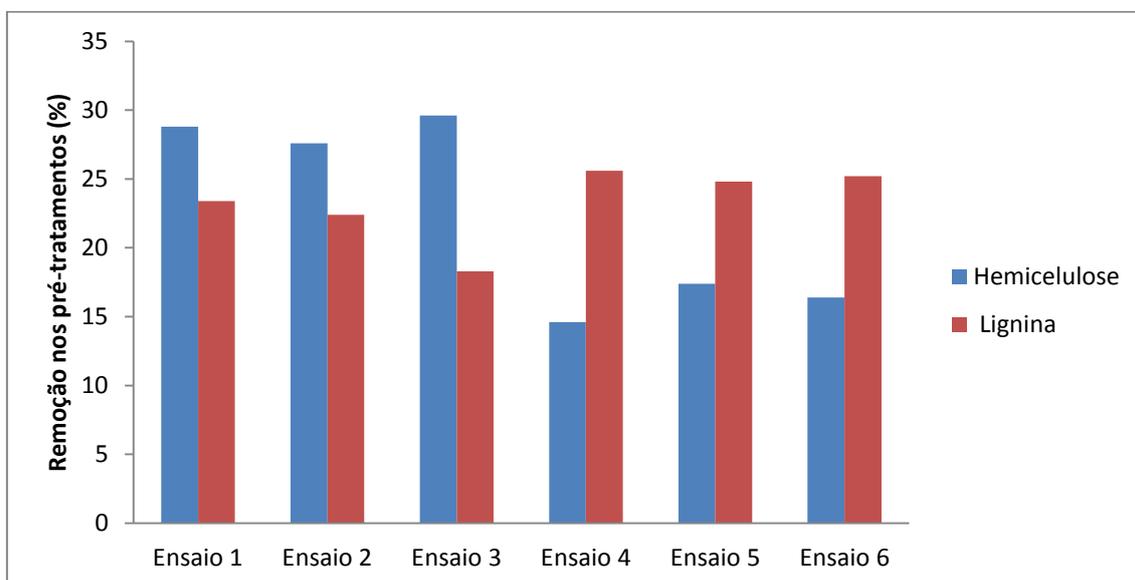


Figura 7 – Percentual de remoção de hemicelulose e lignina nos experimentos.

Conforme exposto na Figura 7, no $\Delta 1$ (Ensaio 1, 2 e 3) a remoção de hemicelulose obteve uma média de 29%, enquanto no $\Delta 2$ (Ensaio 3, 4 e 5) a média ficou em 17%. Já na remoção de lignina o $\Delta 1$ apresentou menor percentual de remoção, quando comparado ao $\Delta 2$. Horst e Behaime (2012) encontraram valores na composição química do *Pinus elliotti* em torno de 30,5% de hemicelulose e 45,3% de celulose pelo método Tappi (T202), e 22,9% de lignina (método Tappi (T222)).

Chen, Han e Xu (2008), observaram que o percentual de hemicelulose da palha de Trigo pré-tratada com aquecimento a 200°C por 10 minutos foi reduzida de 33,3% para 13,6%, enquanto o percentual de lignina foi aumentado de 11,6% para 23,2%. Segundo os autores, tem sido aceito que o pré-tratamento com aquecimento promove a degradação da hemicelulose e a transformação da lignina (OLIVEIRA, 2010).

O resultado exposto na Figura 8 corresponde à massa solubilizada total da biomassa, sendo considerada a extração de hemiceluloses e lignina. Não foram realizadas análises complementares para determinar a solubilização individual de hemiceluloses e lignina.

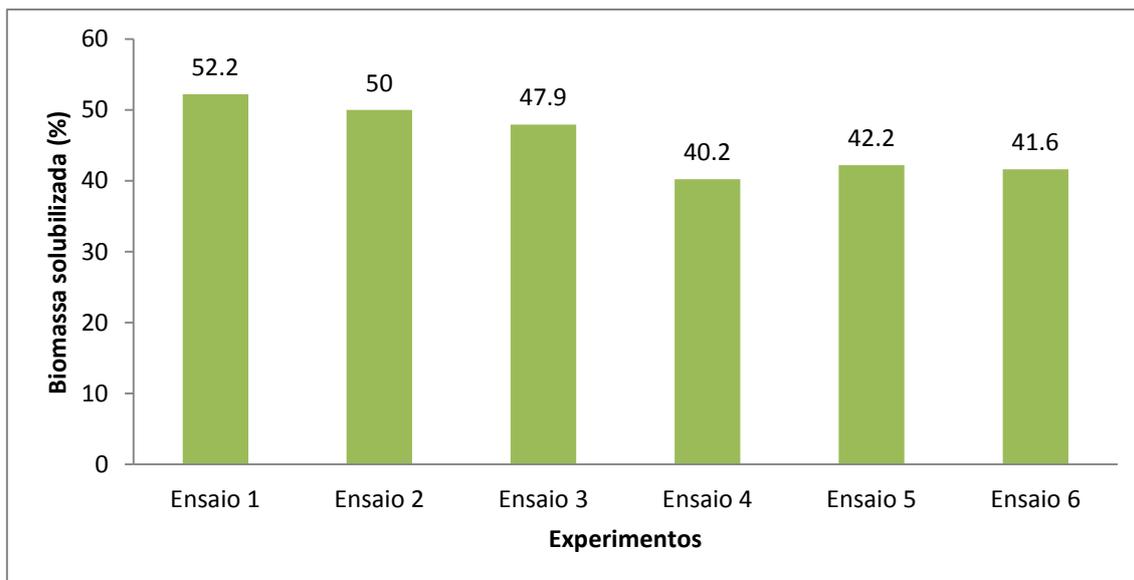


Figura 8 - Massa da biomassa solubilizada após os pré-tratamentos com H_2SO_4 e $NaOH$.

O tratamento $\Delta 1$ solubilizou cerca de 50% da massa da biomassa, já o $\Delta 2$ obteve um rendimento médio de 41%. Após análise estatística conclui-se que há diferença significativa ($p < 0,01$) entre os tratamentos utilizados na solubilização da biomassa lignocelulósica com pressão e temperatura elevada e pressão e temperatura ambiente.

Silva (2009), depois de um pré-tratamento com H_2SO_4 1,0% (m/v) a $120^\circ C$ por 10 minutos, seguido de deslignificação com $NaOH$ 1,0% (m/v) a $100^\circ C$ por 1h, promoveu uma solubilização de 88,8 % de hemicelulose e 77,9% de lignina para a palha de cana, e uma solubilização de 79,3% de hemicelulose e 62,3% de lignina para o pseudocaulo de bananeira. Já o bagaço de cana a solubilização foi de 95,8% de hemicelulose e 80,9% de lignina. Neste trabalho para o *Pinus Elliotti*, no $\Delta 1$ a solubilização de hemicelulose foi de 93,7% e de 93,3% de lignina, enquanto no $\Delta 2$ obteve-se uma solubilização de 53,1% de hemicelulose.

Após o tratamento enzimático o hidrolisado foi submetido à fermentação, promovida pela adição de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, e após 72h foi destilado, obtendo-se o bioetanol. A concentração de álcool das amostras foi determinada por Crioscopia. A Tabela 7 apresenta estes resultados.

Tabela 7 - Concentração e rendimento de etanol nos experimentos.

Experimentos	Ensaio	% Etanol (v/v)	Etanol (g/L)	Conversão a etanol (%)
Δ1	1	0,34	2,7	0,22
	2	0,30	2,4	0,18
	3	0,37	2,9	0,20
Δ2	4	0,23	1,8	0,16
	5	0,20	1,6	0,12
	6	0,24	1,8	0,16

Os melhores rendimentos de etanol foram obtidos no experimento Δ1, em que a biomassa foi submetida ao cozimento, com um rendimento médio de 2,7 g/L no Δ1 e 1,7g/L para o Δ2, representando uma diferença significativa comprovada pela análise estatística ($p < 0,01$). Deve-se levar em consideração que as concentrações de etanol podem estar subestimadas, pois é provável que tenha havido perda significativa de etanol por evaporação durante o experimento (MACHADO, ZANGIROLAMI & ADRIANO, 2009), já que foram realizados a 37°C em estufa e tiveram longa duração. Não foram realizadas análises cromatográficas do destilado do hidrolisado para determinar todos os compostos presentes após a conversão enzimática do resíduo lignocelulósico devido a falta de disponibilidade de equipamento.

Em termos de conversão da biomassa em etanol, os melhores resultados foram obtidos no experimento Δ1, com uma média de conversão de 0,20% da serragem de *Pinus elliotti* em bioetanol. Já para o experimento Δ2, a conversão foi em média de 0,15%. Esse rendimento pode ser elevado, modificando-se as condições experimentais de futuros ensaios de conversão enzimática. Também pode ser realizado um pré-tratamento oxidativo, combinações com outras enzimas, ou realizar a fermentação ao mesmo tempo em que ocorre a sacarificação enzimática.

Horst e Behaime (2012) conseguiram um rendimento de 2,3 g/L de produção de etanol para o *Pinus elliotti*, 3,00 g/L para a *Cedrelinga catenaeformis*, 2,71 g/L para a *Nectandra lanceolata*; 2,55 g/L para a *Myroxylon peruiferum*; 2,27 g/L para a *Balfourodendron riedelianum*; 2,25 g/L para a *Cedrela fissilis* Vell.; 2,22 g/L para a *Laurus nobilis*; 2,18 g/L para a *Ocotea catharinensis*; 1,91 g/L para a *Brosimum spp.*; 1,81 g/L para a *Tabebuia*

cassiniodes; 1,56 g/L para a *Hymenolobium petraeum*, e *Ocotea porosa* com 0,76 g/L. Comparando com os valores obtidos neste trabalho, o *Pinus elliotti* apresentou melhores resultados para o $\Delta 1$, alcançando uma produção média de 2,7 g/L, contra 2,3 g/L destes autores. Ressalta-se que a diferença de produção não é significativa ($p > 0,01$).

Machado, Zangirolami e Adriano (2009) obtiveram para ensaios SSF (Fermentação e Sacarificação Simultâneas) uma produção de etanol a partir de polpa de celulose cerca de três vezes superior aos experimentos realizados com serragem. A concentração de etanol obtida foi de 14g/L com a polpa de celulose e 3g/L com a serragem. Estes valores foram alcançados após 20 horas de cultivo. Isso ocorreu devido à polpa da celulose ser praticamente celulose pura, com estrutura totalmente aberta e por isso alcançou-se uma produção de etanol superior. Outra constatação importante é sobre o papel do pré-tratamento no processo de produção superior de etanol via hidrólise enzimática e fermentação simultâneas.

Martín et al. (2002) obtiveram um rendimento de 8,2g/L de etanol para o bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. Silva (2009) alcançou um rendimento de 20g/L de etanol a partir do bagaço de cana utilizando a levedura *Candida guilliermondii*. Horst e Behaime (2012) utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que produziu etanol na gama de 2,3 g/L, para o *Pinus elliotti*, rendimento inferior aos 2,7g/L obtidos neste trabalho com o experimento $\Delta 1$.

Os resíduos de madeira são comumente utilizados para a geração de calor, sendo queimados em caldeiras para produzir vapor. No entanto, este trabalho contribui na tentativa de reutilizar os resíduos desta matéria-prima, tendo como enfoque o aperfeiçoamento do processo de produção de etanol de segunda geração através de hidrólise (HORST & BEHAIME, 2012). Além disso, os mesmo autores afirmam que pelo menos 30% de cada m³ de madeira serrada produzem cavacos, lascas e serragem. Nas regiões de Santa Catarina e do Paraná existem mais de 4.000 fábricas de processos/transformação de madeira, o que gera um enorme volume de cavacos, lascas, e serragem de madeira produzidos em quantidades consideráveis destas biomassas, se utilizadas para fins energéticos.

Vale ressaltar que também há geração de resíduos durante o processo de produção do etanol 2G (segunda geração). Neste trabalho para produzir 2,9g/L de etanol foram necessários 11,5 litros de água, o que representa um ponto negativo do processo produtivo uma vez que o consumo excessivo de água pode aumentar os custos de produção, além dos efluentes líquidos gerados após cada etapa dos processos de hidrólises.

Na etapa de remoção de hemicelulose o resíduo líquido gerado deve ser tratado devido ao H_2SO_4 presente na solução de hidrólise, o que gera custos com a operação de Estações de Tratamentos de Efluentes (ETE's). No processo de extração de lignina obtém-se o licor negro que pode ser transformado em energia pelo processo de combustão, sendo este um ponto positivo, pois pode suprir as necessidades energéticas das unidades industriais. Após a fermentação e destilação obtém-se a vinhaça, que poderá ser destinada a produção de insumos agrícolas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O pré-tratamento tem grande influência no desempenho do processo. Para as condições empregadas, a remoção de hemicelulose por hidrólise ácida a quente, seguida por pré-tratamento alcalino para remoção de lignina apresentou os melhores resultados.

A hemicelulose obteve uma média de extração de 29% no experimento $\Delta 1$, já o experimento $\Delta 2$ apresentou uma média de 17%. Já na remoção de lignina o experimento $\Delta 1$ apresentou menor percentual de remoção, quando comparado ao experimento $\Delta 2$.

O tratamento $\Delta 1$ solubilizou cerca de 50% da massa da biomassa, já o $\Delta 2$ obteve um rendimento médio de 41%. Após análise estatística conclui-se que há diferença significativa entre os tratamentos utilizados na solubilização da biomassa lignocelulósica, ou seja, o experimento $\Delta 1$ por ser submetido a alta temperatura e pressão possui uma melhor eficiência de extração se comparado ao experimento $\Delta 2$.

Os melhores rendimentos de etanol foram obtidos no experimento $\Delta 1$, em que a biomassa foi submetida ao cozimento, com um rendimento médio de 2,7 g/L no experimento $\Delta 1$ e 1,7g/L para o experimento $\Delta 2$. Em termos de conversão da biomassa em etanol, os melhores resultados foram obtidos no experimento $\Delta 1$, com uma média de conversão de 0,20%. Já para o experimento $\Delta 2$, a conversão foi em média de 0,15%.

A partir das conclusões preliminares, é possível identificar alguns aspectos que requerem estudos mais aprofundados para que seja possível definir condições ótimas para o processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) a partir de resíduos da indústria de papel e celulose, tais como a definição do tempo necessário para a etapa de pré-sacarificação, a influência da temperatura adotada nos experimentos SSF na produção de etanol.

Vale ressaltar que durante os processos de hidrólises para a produção de etanol, são gerados alguns resíduos como efluentes ácidos, vinhaça e licor negro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Cícero L.; ARAUJO, José Carlos. ETANOL CELULÓSICO: “Obtenção do álcool de madeira”. 2012. Disciplina de Seminários. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2012.

ABRAFF - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAFF: ano-base 2012**. Brasília, 2013.

BALAT, Mustafa. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n.2, p. 858-875, 2011.

BARBOSA, Mariana M., **Produção de etanol a partir da palha de cevada**. 2011. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Superior de Tecnologia e de Gestão, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2014.

BRAGATTO, Juliano et. al. Insights on How the Activity of an Endoglucanase Is Affected by Physical Properties of Insoluble Celluloses. **J. Phys. Chem. B**. Campinas, v.116, n. 21, p.6128–6136, 2012.

CARVALHO, Giovani B. M. et al. Estudo do Hidrolisado de Eucalipto em Diferentes Concentrações Utilizando Evaporação a Vácuo para Fins Fermentativos. **Revista Analytica**. Rio de Janeiro, n. 14, p. 54-57, 2005.

CHEMMÉS, Camila S. et al. Estudo de métodos Físico-Químicos no pré-tratamento de resíduos Lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração. In: SEPA - Seminário Estudantil de Produção Acadêmica, 2013, Salvador. **Anais do XII Seminário Estudantil de Produção Acadêmica da Universidade Salvador, BA: UNIFACS**, 2013.

CHEN, Hung-ting et al. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded straw pretreated with alkaline peroxide. **Process Biochemistry**. Taipei City, v. 5, n.9, 2008.

D'ALMEIDA, Maria Luiza O. Celulose e papel – Tecnologia de fabricação da pasta celulósica, v. 1. São Paulo, **IPT**, 1981.

DILLON, Aldo Jose P. Celulases. In: **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004, p. 243-269.

DOMINGUEZ, Jose Miguel O. **Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus**, 2003. 160f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Departamento de Microbiologia III, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2003.

DOWE, Nancy; McMILLAN, James. SSF Experimental Protocols – Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation. **National Renewable Energy Laboratory**, Golden, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42630.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2014.

FENGEL, Dietrich; WEGENER, Gert. **Wood Chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FUENTES, L. L. G. et al. Estudo da Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana e Caracterização do Material Antes e Após o Pré-Tratamento. In: **V EPFEQ - ENCONTRO DE PESQUISA DA FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA / UNICAMP**, Campinas, 2007.

GRANBIO. **Biocombustíveis**. Disponível em: <<http://www.granbio.com.br/biocombustiveis>>. Acesso em: 18 set. 2014

IOPEN Corporation. **Cellulosic ethanol**. Disponível em: <<http://www.iogen.ca/technology/cellulosic-ethanol.html>>. Acesso em 18 set. 2014

HORST, Diego José; BEHAINNE, Jhon Jairo R.; Reutilização De Resíduos De Madeira Para Produção De Etanol De Segunda Geração, Utilizando Hplc Para Mapeamento Do Tratamento Com Ácido Nítrico Diluído (Hno3) E Saccharomyces Cerevisiae. **Revista de Engenharia e Tecnologia**. Campinas, V. 4, n. 2, p. 75-86, 2012.

KÁDÁR, Zsigmond et al. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Industrial Crops and Products**. Budapeste, v. 20, p.103–110, 2004.

KLOCK, Umberto et al. **Química da madeira**. 2005. Texto Acadêmico – Universidade Federal do Paraná, 2005.

KRISHNA, Santosh. H. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. **Bioresource Technology**. Ganeshkhind, v. 77, p.193-196, 2001.

LASER, Mark et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse of bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**. New York, v. 81, p. 33-44, 2002.

LEHNINGER. Albert. L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1989.

MACHADO, Alice.T. et al. **Obtenção De Etanol A Partir De Derivados Do Processamento Do Eucalipto Para Produção De Celulose Por Sacarificação E Fermentação Simultâneas**. In: VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Uberlândia. 2009.

MARZZOCO, Anita., TORRES, Bayardo. B. **Bioquímica básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MCMILLAN, James D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; OVEREND, R. P. (Eds.). **Enzymatic conversion of biomass for fuels production**. Washington: American Chemical Society, 1994.

_____. Bioethanol production: status and prospects. **Renewable Energy**. Washington, v. 10, n. 213, p. 295-302, 1997.

MARTÍN, Carlos et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**. Karlstad, v. 31, n. 3, p. 274–282, 2002.

MARTINS, Rafaela E. **Estudo da imobilização de celulase em geis de quitosana**. 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

MATOSO, LUANA C. **Método crioscópico para quantificação de etanol em bebidas**. 2013. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013.

MELLO Jr., Celso A. et al. Efeito do tratamento a pressão de vapor no bagaço de cana de açúcar sobre a sua degradação *in vitro* e digestibilidade *in vivo*. **Livestock Research for Rural Development**. Piracicaba, v. 1, n. 1, 1989.

OGEDA, Thais Lucy, PETRI, Denise F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Revista Química Nova**. São Paulo, v. 33, n. 7, p.1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, Fernando M. V. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana**. 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2010.

PLATA-OVIEDO, Manuel. **Métodos de quantificação de etanol em destilados pelo método crioscópico**. Técnico de laboratório – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão: UTFPR, 2009.

PEDRO, Nuno C. R. M., **Avaliação do potencial de produção de etanol de 2ª geração a partir dos resíduos das podas do olival**. 2013, 222 f. Tese (Doutorado em Química) – Escola Superior Agrária, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2013.

POLOBIO, 2009. **Biocombustíveis**. Disponível em:
<<http://www.polobio.esalq.usp.br/biocombustiveis.html>.> Acesso em: 18 out. 2014

SANTOS, Elba G. **Estudo da Adsorção de contaminantes orgânicos provenientes da água de extração do petróleo, em coluna de leito fixo, utilizando biomassas como adsorventes**, 2005. 229 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2005.

SANTOS, Fernando A. **Biocombustíveis: prós e contras**. Vila Real: Vila Real, 2008.

SARKAR, Nibedita. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, West Bengal, v.37, n.1, jun. 2012. Disponível em:
<http://www.researchgate.net/publication/229284120_Bioethanol_production_from_agricultural_wastes_An_overview>. Acesso em: 28 set. 2014.

SASSNER, Per et al., Steam pretreatment of H₂SO₄-impregnated Salix for the production of bioethanol. **Bioresource Technology**. Lund, v. 99, n. 4, p. 137–145, 2008.

SILVA, Neumari Luci C., **Produção De Bioetanol De Segunda Geração A Partir De Biomassa Residual Da Indústria De Celulose**. 2010, 109f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, Vinícius F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. 116f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

SIMS, Ralph et al. From 1st to 2st Generation Biofuels Technologies - An overview of current industries and RD&D activities. **OECD/IEA**. Paris, nov. 2008. Disponível em: <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/2nd_biofuel_gen.pdf> Acesso em: 27 out. 2014.

SIVERS, Margareta; ZACCHI, Guido. Ethanol from lignocellulosics: a review of the economy. **Bioresource Technology**. Lund, v. 56, p. 131-140, 1996.

SOARES, Luis Henrique B. et al. Mitigação das emissões de gases efeito estufa pelo uso de etanol da cana-de-açúcar produzido no Brasil. **Embrapa Agrobiologia**. Seropédica, 2009.

SUASSUNA, João. A CULTURA DO PINUS: uma perspectiva e uma preocupação. **Brasil Florestal**. São Paulo, v. 8, n. 29, 1977.

SUN, Ye; CHENG, Jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, **Bioresource Technology**, Carolina do Norte, v. 83, p. 1-11, 2002.