



RODRIGO GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONDIÇÕES
OPERACIONAIS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA
PRODUÇÃO DE ETANOL**

**LAVRAS – MG
2019**

RODRIGO GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONDIÇÕES OPERACIONAIS NA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Engenharia Química, para obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Luciano Jacob Corrêa
Orientador

**LAVRAS – MG
2019**

RODRIGO GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONDIÇÕES OPERACIONAIS NA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

**EVALUATION OF DIFFERENT OPERATIONAL CONDITIONS IN ENZYMATIC
HYDROLYSIS FOR ETHANOL PRODUCTION**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Engenharia Química, para obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 25 de junho de 2019.

Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira
Prof. Dr. João Moreira Neto

UFLA
UFLA

Prof. Dr. Luciano Jacob Corrêa
Orientador

**LAVRAS – MG
2019**

*Dedico este trabalho em especial, aos meus pais, minha namorada Gabrielle
e a meu avô Constantino Pedro Gonçalves (in memoriam),
que sempre estiveram ao meu lado.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre cumprir suas promessas e tornar possível a realização deste sonho, me sustentando e guiando durante toda esta caminhada.

Aos meus pais, Rogerio e Lucimar, pelo constante apoio, incentivo, amor, carinho e suporte nesta conquista.

À minha namorada, Gabrielle Martins, por ter chegado para se tornar meu combustível e um dos principais motivos de toda garra na luta por esta glória.

Às minhas irmãs, Letícia e Natália, e toda minha família que sempre se orgulharam e me apoiaram nesta jornada.

Aos meus sogros, Sandro e Fátima, por todo apoio, carinho e incentivo durante esta árdua caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Jacob Corrêa, por aceitar este desafio, depositando sua confiança em mim. Agradeço também por todo apoio, amizade, pelos preciosos ensinamentos e orientações durante toda execução e elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira do DEG - UFLA, por ter disponibilizado o laboratório para realização deste trabalho, também pelos incentivos e pela amizade.

Ao Departamento de Ciência dos Alimentos – UFLA, por ceder o laboratório para realização das análises requeridas no presente trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Engenharia, pela oportunidade.

Aos meus colegas do curso de Engenharia Química - UFLA e aos meus amigos José Matheus, Fabiano, João Paulo e Samuel que sempre me ajudaram.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

O aproveitamento de resíduos agrícolas é visto como uma alternativa promissora para produção de biocombustíveis, visando tanto aspectos ambientais quanto econômicos. Dentre as biomassas lignocelulósicas de maior importância e disponibilidade no território nacional, o bagaço de cana-de-açúcar (BCA) ocupa uma posição de destaque no que tange a produção de etanol de segunda geração. Esta produção envolve algumas etapas adicionais em relação ao processo de produção do etanol de primeira geração, trazendo alguns desafios em relação a viabilidade técnica e econômica da produção em larga escala do etanol celulósico. Uma das etapas desafiadoras e fundamentais na produção de etanol lignocelulósico é a hidrólise enzimática, etapa onde tem-se a conversão dos polissacarídeos presentes na biomassa em açúcares fermentescíveis que posteriormente, na fermentação, são convertidos a etanol. Um dos principais desafios envolve a otimização da hidrólise, neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo realizar o estudo de diferentes condições operacionais na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo método de explosão a vapor. Neste estudo, foram analisados os efeitos na hidrólise enzimática de duas importantes variáveis do processo, cargas de sólidos (bagaço de cana-de-açúcar) e de enzimas. As condições foram avaliadas considerando a concentração final de glicose e a produtividade de glicose, bem como alguns fatores inerentes ao processo produtivo industrial. Os experimentos de hidrólise enzimática (pH 4,8, 50 °C, 48 h) foram realizados em frascos de 250 mL (volume reacional de 50 mL). As cargas de enzimas avaliadas foram de 5, 10 e 20 FPU/g_{BCA} e as cargas de sólidos de 5, 10 e 20%. Foram avaliadas nove condições operacionais, que compreendem a cada carga de enzimas sendo avaliada para as três cargas de sólidos. Os resultados obtidos demonstraram que o aumento na carga de enzimas e de sólidos resultaram em maiores concentrações finais de glicose (48 h de hidrólise). Considerou-se como melhor resultado obtido, a condição operacional com carga enzimática de 10 FPU/g_{BCA} e carga de sólidos de 10%, alcançando a concentração de glicose em 48 h de hidrólise de $101,693 \pm 8,436$ g/L.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Etanol de segunda geração. Hidrólise enzimática. Cargas de enzimas. Cargas de sólidos. Concentração de glicose.

ABSTRACT

The use of agricultural waste is seen as a promising alternative for the production of biofuels, aiming at both environmental and economic aspects. Among the lignocellulosic biomasses of major importance and availability throughout the national territory, sugarcane bagasse (SB) occupies a prominent position in relation to the production of second generation ethanol. This production involves some additional steps in relation to the production process of first generation ethanol, bringing some challenges in relation to the technical and economical viability of the large-scale production of cellulosic ethanol. One of the most challenging and fundamental steps in the production of lignocellulosic ethanol is the enzymatic hydrolysis, where the conversion of polysaccharides present in the biomass into fermentable sugars is carried out, which by fermentation are converted to ethanol. One of the main challenges involves hydrolysis optimization, in this context, the present study aimed at the studying of different operational conditions in the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion. In this study, the effects on enzymatic hydrolysis of two important process variables, solids loading (sugarcane bagasse) and enzymes were analyzed. The conditions were evaluated considering the final concentration of glucose and the glucose productivity, as well as some factors inherent to the industrial production process. Enzymatic hydrolysis experiments (pH 4.8, 50 °C, 48 h) were carried out in 250 mL vials (50 mL reaction volume). The enzyme loading evaluated were 5, 10 and 20 FPU/g_{BCA} and the solids loading of 5, 10 and 20%. Nine operating conditions were evaluated, which comprise each enzyme loading being evaluated for the three solids loading. The results showed that the increase in enzyme and solids loading resulted in higher final concentrations of glucose (48 h of hydrolysis). The operational result with enzymatic loading of 10 FPU/g_{BCA} and solids loading of 10% was considered as the best result obtained, reaching the glucose concentration in 48 h of hydrolysis of 101.693 ± 8.436 g/L.

Keywords: Sugarcane bagasse. Second generation ethanol. Enzymatic hydrolysis. Enzymes loading. Solids loading. Glucose concentration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Porcentagem de unidades de autoveículos novos licenciados no Brasil em função do tipo de combustível.....	4
Figura 2 - Estrutura da parede celular.	6
Figura 3 - Etapas produtivas do E2G.....	8
Figura 4 - Ação do pré-tratamento sobre a biomassa lignocelulósica.	9
Figura 5 - Processo produtivo do E1G a partir da cana e do E2G a partir do BCA.	18
Figura 6 - Curva analítica padrão de glicose.	24
Figura 7 - Perfil de concentração de glicose em g/L em função do tempo de hidrólise para as cargas de 5, 10 e 20% de sólidos e carga de enzima de 5 FPU/g _{BCA}	28
Figura 8 - Perfil de concentração de glicose em g/L em função do tempo de hidrólise para as cargas de 5, 10 e 20% de sólidos e carga de enzima de 10 FPU/g _{BCA}	31
Figura 9 - Perfil de concentração de glicose em g/L em função do tempo de hidrólise para a cargas de 5, 10 e 20% de sólidos e carga de enzima de 20 FPU/g _{BCA}	34
Figura 10 - Perfil de concentração de glicose ao longo da hidrólise para cargas de sólidos de (a) 5, (b) 10 e (c) 20% com carga enzimática de 5, 10 e 20 FPU/g _{BCA}	35
Figura 11 - Perfil de produtividade de glicose ao longo da hidrólise para as cargas de enzimas de (a) 5, (b) 10 e (c) 20 FPU/g _{BCA} e cargas de sólidos de 5, 10 e 20%.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química de diferentes tipos de materiais lignocelulósicos.	5
Tabela 2 - Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos.	10
Tabela 3 - Condições e desempenho das três técnicas de hidrólise.....	14
Tabela 4 - Caracterização química do bagaço explodido.	23
Tabela 5 - Concentração de glicose para a configuração de 5 FPU/g _{BCA} e 5% de sólidos.	26
Tabela 6 - Concentração de glicose para a configuração de 5 FPU/g _{BCA} e 10% de sólidos. ...	26
Tabela 7 - Concentração de glicose para a configuração de 5 FPU/g _{BCA} e 20% de sólidos. ...	27
Tabela 8 - Concentração de glicose para a configuração de 10 FPU/g _{BCA} e 5% de sólidos. ...	29
Tabela 9 - Concentração de glicose para a configuração de 10 FPU/g _{BCA} e 10% de sólidos. .	29
Tabela 10 - Concentração de glicose para a configuração de 10 FPU/g _{BCA} e 20% de sólidos.	30
Tabela 11 - Concentração de glicose para a configuração de 20 FPU/g _{BCA} e 5% de sólidos. .	32
Tabela 12 - Concentração de glicose para a configuração de 20 FPU/g _{BCA} e 10% de sólidos.	32
Tabela 13 - Concentração de glicose para a configuração de 20 FPU/g _{BCA} e 20% de sólidos.	33
Tabela 14 - Teste Tukey para 5 FPU/g _{BCA} variando a carga de sólidos.....	37
Tabela 15 - Teste Tukey para 10 FPU/g _{BCA} variando a carga de sólidos.....	37
Tabela 16 - Teste Tukey para 20 FPU/g _{BCA} variando a carga de sólidos.....	37
Tabela 17 - Teste Tukey para 5% de sólidos variando a carga enzimática.	38
Tabela 18 - Teste Tukey para 10% de sólidos variando a carga enzimática.	38
Tabela 19 - Teste Scott-Knott para 20% de sólidos variando a carga enzimática.....	38

LISTA DE SIGLAS

ANP	Agência Nacional do Petróleo
AFEX	<i>Ammonia Fiber Explosion</i>
BCA	Bagaço de Cana-de-Açúcar
EG	Endoglunases
CBH	Celobiohidrolases
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
E1G	Etanol de Primeira Geração
E2G	Etanol de Segunda Geração
E3G	Etanol de Terceira Geração
GEE	Gases de Efeito Estufa
BGL	β -glicosidases
HMF	Hidroximetilfufural
LHW	<i>Liquid Hot Water</i>
ML	Materiais lignocelulósicos
OPEP	Organização dos Países Exportadores de Petróleo
SFS	Sacarificação e Fermentação Simultâneas
HFS	Hidrólise e Fermentação Separadas
TDSP	Tartarato Duplo de Sódio e Potássio

LISTA DE SÍMBOLOS

H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
M	Concentração Molar (mol/L)
C _{Glicose}	Concentração de Glicose (g/L)
SO ₂	Dióxido de Enxofre
FPU/g _{BCA}	Unidade de Papel de Filtro por Grama de BCA
CO ₂	Gás Carbônico
<i>Glicose</i>	Concentração Média de Glicose (g/L)
g	Gramas
g/L	Gramas por Litro
°C	Graus Celsius
°GL	Graus Gay Lussac
°INPM	Graus INPM (Instituto Nacional de Pesos e Medidas)
NaOH	Hidróxido de Sódio
h	Horas
L	Litros
m	Massa (g)
MPa	Mega Pascal
μmol	Micromol
mL	Mililitros
min	Minutos
nm	Nanômetros
pH	Potencial Hidrogeniônico
P	Produtividade (g/L.h)
Kg	Quilogramas
rpm	Rotações por Minuto
t	Tempo (h)
v	Volume (mL)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Objetivos.....	2
2	REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1	Biocombustíveis - Etanol.....	3
2.2	Biomassa lignocelulósica.....	5
2.2.1	Bagaço de cana-de-açúcar	7
2.3	Etapas de produção do E2G.....	7
2.3.1	Pré-tratamento.....	8
2.3.1.1	Moagem de bolas.....	11
2.3.1.2	Explosão a vapor.....	11
2.3.1.3	Alcalinos	12
2.3.1.4	Biológicos	13
2.3.2	Hidrólise	13
2.3.2.1	Hidrólise ácida.....	14
2.3.2.2	Hidrólise enzimática	14
2.3.3	Fermentação.....	17
2.3.4	Destilação	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Materiais	19
3.2	Determinação da umidade do bagaço de cana-de-açúcar	19
3.3	Hidrólise enzimática	19
3.4	Preparo do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).....	20
3.5	Curva padrão de glicose.....	20
3.6	Quantificação de açúcares redutores	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23

4.1	Determinação da umidade	23
4.2	Caracterização química da biomassa	23
4.3	Atividade enzimática	24
4.4	Obtenção da curva padrão de glicose	24
4.5	Quantificação de glicose.....	25
4.5.1	Concentração de glicose	25
4.5.2	Análise estatística	36
4.5.3	Produtividade.....	39
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
6	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

A preocupação mundial com o meio ambiente tem crescido significativamente nos últimos anos, resultando em uma corrida tecnológica pela busca do desenvolvimento de fontes de energia renováveis e limpas. Diante deste cenário, houve um aumento no interesse pela utilização dos resíduos agrícolas para obtenção de combustíveis renováveis de modo a minimizar os impactos ambientais gerados pelo uso de combustíveis fósseis, bem como suprir a demanda energética mundial (LUCARINI et al., 2017).

Os combustíveis fósseis ainda são as principais fontes energéticas mundial, porém este combustível apresenta uma limitação relacionada ao seu potencial poluidor, sendo um dos principais responsáveis pela emissão dos gases de efeito estufa (GEE), além de ser uma fonte energética limitada. Portanto, o uso de biocombustíveis representa uma das alternativas mais efetivas na redução das emissões dos gases de efeito estufa associados ao consumo energético no setor de transporte. Além disso, ressalta-se que os biocombustíveis reduzem a dependência mundial dos combustíveis fósseis como fonte de energia (NYKO et al., 2010).

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) é um subproduto agrícola gerado após a extração do caldo de cana-de-açúcar e se encontra entre as principais fontes de biomassa celulósica disponível para o uso industrial. Dentre as diversas aplicações para esta fonte de biomassa cita-se a obtenção de açúcares para a posterior produção de etanol combustível de interesse mundial. O etanol combustível pode ser obtido diretamente do caldo de cana-de-açúcar, sendo denominado etanol de primeira geração (E1G) ou a partir de materiais lignocelulósicos (ML), como o BCA, recebendo a denominação de etanol de segunda geração (E2G), além destes, cita-se a utilização de microrganismos, como microalgas marinhas, para produção do etanol de terceira geração (E3G) (CARLY, 2011; FARIAS, 2014).

De acordo com a União da Indústria de cana-de-açúcar (2019), o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com cerca de 641 milhões de toneladas processadas e aproximadamente 28 bilhões de litros de etanol de primeira geração, na safra 2017/2018. A consequência dessa quantidade de cana produzida é a grande quantidade de BCA e palha de cana-de-açúcar, aproximadamente 280 Kg (base seca) de resíduos por tonelada de cana moída. Desta quantidade de resíduos parte é destinada para queima direta na geração de energia e o restante pode ser designado para produção de E2G (MACEDO, 2001).

A biomassa celulósica, como o BCA, é composta majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina. As porções celulósicas e hemicelulósicas da biomassa, compreendem cerca de 40 a 50% e 20 a 30% do peso seco da planta, respectivamente. Estas porções são

polissacarídeos que podem ser hidrolisados a açúcares e, em seguida, fermentados e destilados culminando na produção do E2G. A conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis ocorre via hidrólise ácida ou hidrólise enzimática, sendo que a segunda rota envolve a hidrólise da celulose à glicose em meio aquoso catalisado por enzimas, que tem reduzida taxa de rendimento e necessita de pré-tratamento, de modo a quebrar a estrutura cristalina da lignocelulose e remover a lignina, expondo as moléculas de celulose para a ação enzimática (OGEDA; PETRI, 2010).

Ressalta-se que a hidrólise enzimática também apresenta menor consumo energético em relação à hidrólise ácida, já que opera em condições mais brandas de temperatura, pH e pressão, sendo também uma via mais específica, sem formação de produtos de degradação promotores de efeitos indesejáveis na etapa de fermentação. Entretanto, a implementação da hidrólise enzimática em larga escala apresenta dificuldades de viabilidade técnica e econômica (SOUZA et al., 2014).

Na produção de E2G, a hidrólise enzimática é uma etapa desafiadora e determinante sobre a eficiência global do processo, portanto, para viabilizar esta rota tecnológica em larga escala deve-se buscar sua otimização, que consiste no aumento da concentração de substrato, redução da concentração de enzimas e do tempo da referida etapa, além da utilização de enzimas de maior eficiência. No aumento da carga de enzimas e de substrato, o objetivo envolve a obtenção de concentrações mais altas de açúcares hidrolisados, embora seja necessário aferir se o aumento nas cargas não resultou na inibição enzimática e gastos dispensáveis para o processo (SOUZA et al., 2014).

1.1 Objetivos

A partir do exposto, objetiva-se a partir deste trabalho estudar algumas das variáveis envolvidas no processo de hidrólise enzimática, que consiste em avaliar experimentalmente o efeito das concentrações de substrato e enzima na etapa de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e determinar a melhor condição operacional para esta etapa determinante e desafiadora na produção de E2G.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A busca por novos combustíveis tornou-se inevitável, uma vez que a forma com que a energia vem sendo produzida e consumida é incompatível com o desenvolvimento sustentável do planeta, principalmente em razão dos impactos ambientais, dos conflitos e dos impactos econômicos gerados pelo petróleo, principal combustível utilizado no mundo. Neste âmbito, visando um desenvolvimento sustentável existem diversas fontes de energias alternativas como eólica, solar, maremotriz e geotérmica, destacando-se a energia da biomassa (LUCON; GOLDEMBERG, 2006; CARLY, 2011).

A biomassa pode ser proveniente de resíduos agrícolas, resíduos florestais e resíduos industriais. No Brasil, a biomassa mais abundante é o BCA, proveniente da atividade agrícola do processamento da cana-de-açúcar. O principal destino desta biomassa é a queima direta em caldeiras para geração de vapor e energia elétrica nas usinas de cana-de-açúcar, contudo o BCA apresenta considerável potencial para produção de E2G, devido a seu alto teor de celulose e hemicelulose presentes em sua composição (SARKAR et al., 2012).

O Brasil destaca-se mundialmente na produção de biocombustíveis, especialmente na composição da matriz energética nacional (45% proveniente de fontes renováveis) e no total de combustíveis consumidos internamente, sendo 18% a taxa para biocombustíveis (ANP, 2019). Este panorama representa uma oportunidade estratégica em meio a um cenário global de crescente demanda por fontes de energia renováveis e limpas. Particularmente para a produção de etanol as características locais, o aporte tecnológico do país e os incentivos governamentais são fatores extremamente favoráveis (CORRÊA, 2016).

2.1 Biocombustíveis - Etanol

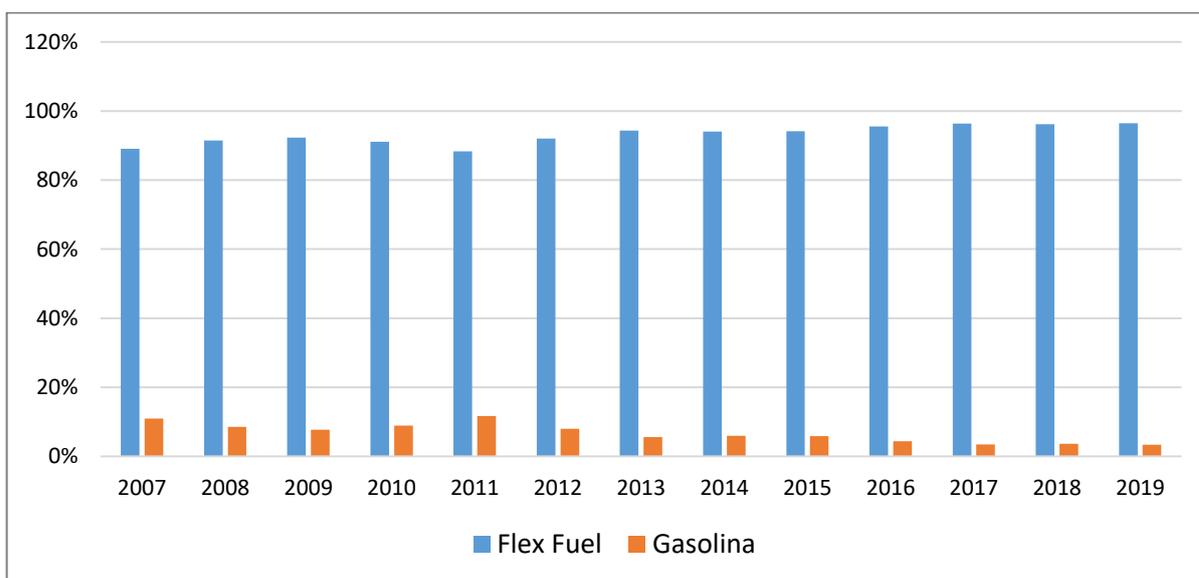
Biocombustíveis, como bioetanol e biodiesel, são derivados de biomassas renováveis, capazes de suprir de forma parcial ou completa os combustíveis fósseis em motores de combustão interna ou em outro processo gerador de energia. Estes biocombustíveis podem desempenhar um papel relevante na redução expressiva de emissões de dióxido de carbono e na dependência de recursos não renováveis, sendo competitivos no mercado em relação à gasolina e ao diesel (ANP, 2019; PRATTO, 2015).

Dentre os biocombustíveis existentes, o etanol desponta como promissor uma vez que é produzido a partir de diferentes matérias-primas renováveis e por diferentes rotas tecnológicas de conversão, seja de primeira ou de segunda geração. Enquanto o E1G baseia-se na fermentação alcoólica dos carboidratos simples presentes na biomassa ou em hidrolisados

enzimáticos, o E2G ou etanol celulósico, é obtido a partir da celulose presente nos materiais lignocelulósicos. Ressalta-se que o Brasil e os Estados Unidos são os maiores produtores de etanol no mundo, cada um utiliza fonte de açúcares fermentescíveis a partir da cana-de-açúcar e do milho, respectivamente (PITARELO et al., 2012).

O etanol de cana-de-açúcar começou a ser produzido e utilizado como combustível no Brasil em meados do século XX, devido à instabilidade no preço do açúcar no mercado interno e o foco pela redução na dependência do petróleo. Nos anos 70, com a primeira crise do petróleo, houve a supervalorização deste combustível como resultado da retaliação dos países membros da Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEP) ao apoio dos Estados Unidos a Israel durante a Guerra do Yon Kippur. O reflexo disso para o Brasil foi a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) em 1975, com o objetivo de misturar até 20% de etanol anidro na gasolina, em substituição do chumbo tetraetila, produto importado e com alto poder de poluição. Outro objetivo intrínseco era a garantia da segurança energética do Brasil e a prevenção contra a crise no balanço de pagamentos, devido ao intenso aumento no preço do petróleo e a crescente dependência deste combustível para consumo interno (SILVA, 2016; CORRÊA, 2016). Segundo os referidos autores, houve em 2003 o lançamento dos carros *Flex Fuel*, que funcionam com gasolina, etanol anidro ou qualquer proporção entre ambos e o resultado desse movimento encontra-se nas vendas de veículos no Brasil, no período de 2007 a março de 2019, representada na Figura 1.

Figura 1 - Porcentagem de unidades de autoveículos novos licenciados no Brasil em função do tipo de combustível.



Fonte: UNICA e ANFAVEA (2019).

De acordo com Pratto (2015), a produção de álcool que sofreu um alavanco em 2003 continua a crescer até os dias atuais, sofrendo variações como qualquer produto. Ressalta-se também que a área cultivada com cana-de-açúcar acompanhou este crescimento produtivo, culminando em pesquisas voltadas ao desenvolvimento de processos biotecnológicos que viabilizaram a produção de E2G e assim, incrementando a produção de etanol sem o aumento da área de cultivo de cana, além do melhoramento no aproveitamento da matéria-prima. Para Carly (2011), isso significa maior viabilidade do custo e das tecnologias para produção de E2G, em função do aumento na produção deste biocombustível, com reflexos diretos sobre benefícios ambientais, econômicos e tecnológicos, especialmente sobre o desempenho dos veículos, pois este combustível possui alto valor de octanagem, proporcionando melhor rendimento aos motores a combustão.

2.2 Biomassa lignocelulósica

Biomassa lignocelulósica é o termo usado para identificação da matéria-prima renovável de origem vegetal, que é a principal fonte de energia renovável disponível no meio ambiente e apresenta-se como promissora fonte de baixo custo e grande predisposição para produção de etanol (SARKAR et al., 2012). De acordo com Farias (2014) e Pratto (2015), essas biomassas são constituídas basicamente de celulose, hemicelulose e lignina, que juntas correspondem a 90% da biomassa seca. A quantidade de cada um desses componentes lignocelulósicos é observada na Tabela 1, onde permite inferir que existe uma variação que decorre em função da espécie vegetal, idade, solo de cultivo, aspectos relacionados ao clima e outros fatores.

Tabela 1 - Composição química de diferentes tipos de materiais lignocelulósicos.

Materiais lignocelulósicos	Composição química (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Palha de cana-de-açúcar	40 – 44	30 – 32	22 – 25
Bagaço de cana-de-açúcar	32 – 48	19 – 24	23 – 32
Casca de soja	29 – 51	10 – 20	2 – 8
Algodão	85 – 95	5 – 15	0

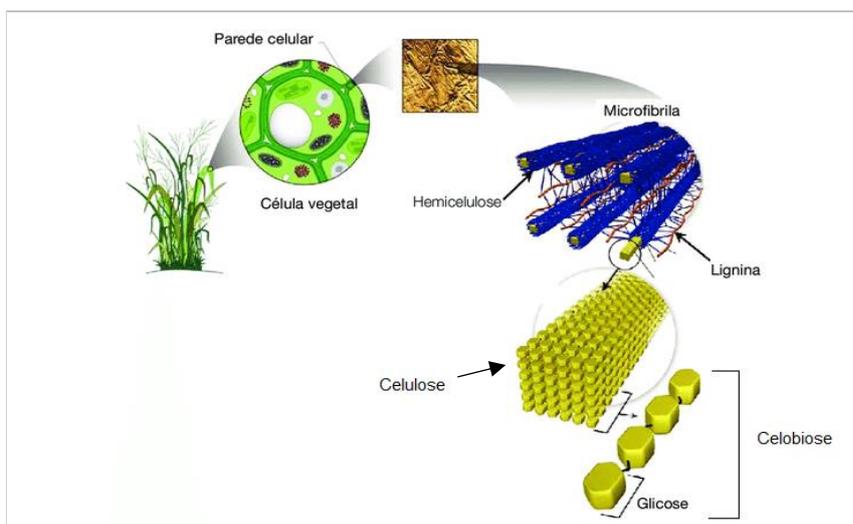
Fonte: Adaptado de Pratto (2015).

A celulose é um polímero natural linear constituído por cadeias não ramificadas de unidades de D-Glicose, unidas por ligações β -1,4-glicosídicas. As moléculas de glicose se ligam via carbonos 1 e 4, formando a celobiose, unidade repetidora. A existência de grupos hidroxilas possibilita a formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares que configura regiões rígidas e organizadas entre as cadeias, conferindo rigidez à planta. A hemicelulose, formada pela combinação de vários tipos de monossacarídeos, é um heteropolissacarídeo amorfo composto principalmente por hexoses (glicose, manose, galactose) e pentoses (arabinose e xilose), com algumas quantidades de ácido D-glucurônico e ácido 4-o-metil-glucurônico. Este heteropolissacarídeo atua como um agente ligante entre as frações de celulose e lignina (SAAD, 2010).

A lignina, atrás da celulose, é a segunda macromolécula mais abundante da terra, que atua na rigidez e impermeabilidade dos ML, além de resistência, proteção a ataques microbiológicos e danos mecânicos. Esta macromolécula é composta por unidades de fenilpropano, formado via polimerização radicalar dos precursores álcoois coniferílico, sinapílico e p-cumarílico, atribuindo sua estrutura tridimensional, amorfa e de difícil desestruturação. A lignina pode ser associada com uma cola, já que atua promovendo maior coesão entre os diferentes constituintes presentes na matriz lignocelulósica e tornando a biomassa impermeável (FENGEL; WEGNER, 1989; ZENG et al., 2014). É fundamental na produção de E2G uma etapa de eliminação da maior parte da lignina para obtenção de rendimentos melhores na hidrólise enzimática.

É possível observar na Figura 2 a representação esquemática da configuração dos constituintes, celulose, hemicelulose e lignina, na parede celular vegetal.

Figura 2 - Estrutura da parede celular.



Fonte: Adaptado de Canilha et al. (2009).

Ademais dos principais constituintes encontrados na biomassa lignocelulósica (celulose, hemicelulose e lignina), em sua composição também se encontram (i) substâncias extrativas, como as ceras, ácidos graxos, terpenos, álcoois, esteroides e compostos fenólicos de baixa massa molar, solúveis em água ou solventes e; (ii) substâncias não-extrativas, que são majoritariamente substâncias inorgânicas como as cinzas (PRATTO, 2015).

2.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é uma fonte abundante de material lignocelulósico, resultante da extração do caldo de cana, obtido após a passagem do colmo por moendas ou difusores. Esta biomassa é um dos subprodutos mais abundantes disponíveis no Brasil, apresentando baixo custo de produção e transporte, além de ser um substituto do combustível fóssil e da madeira na geração de vapor e energia elétrica (OLIVEIRA, 2011; LUCARINI et al., 2017).

A moagem é um processo estritamente volumétrico, onde o caldo é deslocado conforme ocorre a passagem do colmo da cana entre dois rolos próximos, resultando em um volume de caldo e outro de bagaço. Na difusão, ocorre a compressão máxima da cana-de-açúcar e a sacarose, que ainda persiste no material fibroso é dissolvida e removida por lixiviação, através de difusores. O referido método é mais eficiente em relação a moagem convencional, uma vez que amplia a porcentagem de caldo quando se usa difusores o que condiciona em bagaços de cana com teor residual de sacarose variável se comparado com a extração via moendas (OLIVEIRA, 2011).

Segundo Macedo (2001), cada tonelada de cana-de-açúcar produz cerca de 140 Kg de bagaço (base seca). Esse dado, associado ao processamento de 641 milhões de toneladas de cana na safra 2017/2018, implicou na geração de 89,74 milhões de toneladas de bagaço seco. Em concordância com Rosa e Garcia (2009), a eficiência da hidrólise enzimática da celulose é em torno de 75 a 80%, significando que uma tonelada de bagaço seco permitiria a produção de 350 L de E2G (considerando a eficiência de fermentação da glicose de 90%), valores consideráveis de produtividade.

2.3 Etapas de produção do E2G

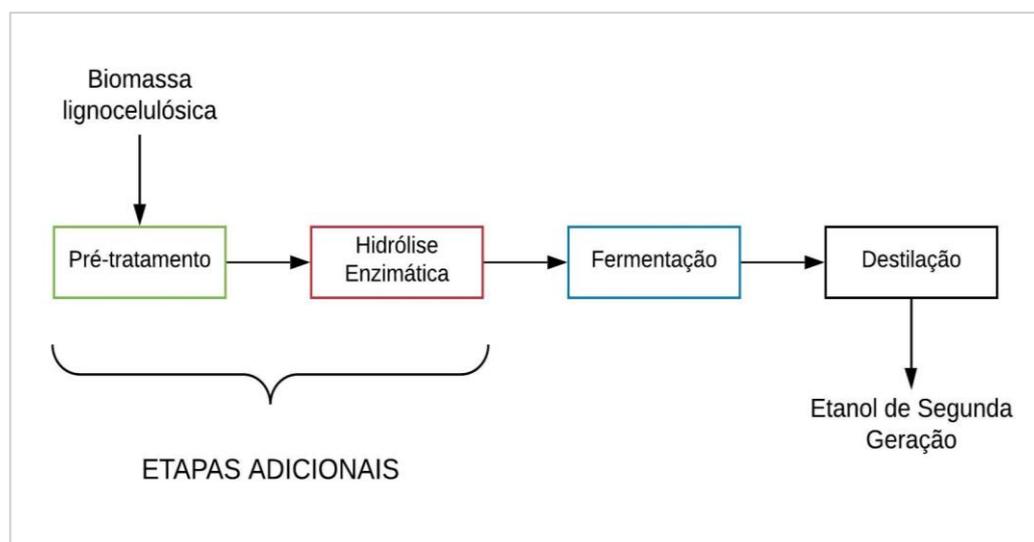
O E2G ainda apresenta maior custo de produção quando comparado ao E1G, devido principalmente às etapas adicionais necessárias no processo, no entanto, os avanços indicam que seu custo de produção será menor que o E1G, em função do aumento pelo interesse por

este produto e dos investimentos em pesquisa e tecnologia. Além disso, um destaque importante que favorece o E2G é seu rendimento máximo, até 17 mil litros por hectare de cana plantada, enquanto o E1G rende 6,9 mil litros por hectare (NOVA CANA, 2015).

O cenário para produção de E2G é extremamente promissor, mas ainda existem obstáculos no processo produtivo, dos quais cita-se a etapa de desestruturação da lignina presente na biomassa de modo a liberar os polissacarídeos fontes de açúcares fermentescíveis. Portanto, Pratto (2015) destaca a essencialidade de uma etapa de pré-tratamento que promova a remoção da lignina, expondo a celulose e ainda, uma etapa de hidrólise para conversão dos polissacarídeos em monômeros de glicose, posteriormente fermentados e destilados produzindo o E2G.

Ressalta-se que a produção de E2G apresenta as etapas adicionais de (1) pré-tratamento e (2) hidrólise ácida ou enzimática, em relação ao processo produtivo do E1G. A sequência das etapas para produção do E2G, empregando a hidrólise enzimática é observada de forma simplificada na Figura 3.

Figura 3 - Etapas produtivas do E2G.



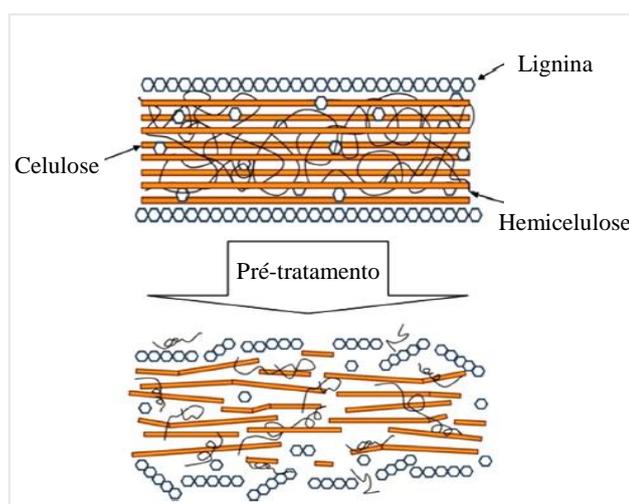
Fonte: Do autor (2019).

2.3.1 Pré-tratamento

Os materiais lignocelulósicos apresentam características, como o revestimento da celulose pela lignina, que dificultam a degradação enzimática da celulose, isto é, dificulta a obtenção dos açúcares fermentescíveis. Diante desta situação, uma das etapas produtivas significativa em relação ao custo de produção do E2G é o pré-tratamento, além de influenciar diretamente no rendimento das etapas seguintes do processo (CORRÊA, 2016).

Na ausência da etapa de pré-tratamento a obtenção de açúcares fermentescíveis por meio da celulose ocorre de forma lenta, já que a celulose se encontra envolvida por uma matriz de lignina e hemicelulose. Assim, a função do pré-tratamento é aumentar o desempenho da etapa de hidrólise enzimática e proporcionar a redução na quantidade de enzimas necessárias nesta etapa (CARLY, 2011). Dentre as finalidades do pré-tratamento destacam-se a remoção da lignina e hemicelulose, diminuição do grau de polimerização e cristalinidade da celulose, aumento da área superficial da biomassa e também proporcionar às enzimas maior acesso aos polissacarídeos na etapa de hidrólise, além de reduzir a formação de inibidores nas etapas subsequentes do processo (MARTINS et al., 2014). A Figura 4, exemplifica o efeito da ação do pré-tratamento na estrutura da biomassa lignocelulósica.

Figura 4 - Ação do pré-tratamento sobre a biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de Mood et al. (2013).

A utilização do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos iniciou diante da fabricação de papel e celulose, quando a ciência da madeira constatou uma melhor remoção da lignina dos cavacos de madeira após o pré-tratamento adequado. No início, este método também foi empregado na busca por melhorar a digestibilidade da forragem servida aos ruminantes (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016). O químico e farmacêutico francês Henri Braconnot, descobriu em 1819 que o tratamento da madeira com ácido sulfúrico concentrado resultava em glicose e desde então, várias alternativas de pré-tratamento foram propostas para degradar o complexo lignocelulósico, constituído por uma matriz de celulose e lignina, envolta por hemicelulose (SILVA, 2018).

Há uma grande diversidade de métodos propostos na literatura que podem proporcionar diferentes efeitos na estrutura da biomassa. Estes métodos são classificados em relação a sua

natureza (químicos, físicos, biológicos e a combinação entre estes). Cada pré-tratamento atua de forma diferente na estrutura da biomassa, os métodos físicos, como moagem e extrusão, não alteram a composição da biomassa, mas aumentam a área superficial e proporcionam a redução da cristalinidade. Nos tratamentos alcalinos, oxidativos, biológicos e *Ammonia Fiber Explosion (AFEX)*, ocorre essencialmente a remoção da lignina. Já nos tratamentos ácidos, explosão a vapor e *Liquid Hot Water (LHW)* há a formação de duas correntes de processo, uma líquida contendo a hemicelulose removida e uma sólida majoritariamente composta por celulose e lignina (MORO, 2015).

Na Tabela 2 estão especificados alguns pré-tratamentos utilizados na produção de E2G, separados por tipo de processo e a descrição do mecanismo de alteração da biomassa.

Tabela 2 - Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos.

Método	Processo	Mecanismo de alteração
Físicos	<ul style="list-style-type: none"> - Moagem de bolas; - Moagem de rolos; - Moagem de martelos; - Extrusão; - Expansão. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento da área de contato e tamanho dos poros; - Diminuição da cristalinidade da celulose e seu grau de polimerização; - Hidrólise parcial das hemiceluloses; - Despolimerização parcial da lignina.
Químicos	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Alcalinos</u>: Hidróxido de sódio, Amônia, Sulfato de amônia; - <u>Gás</u>: Dióxido de cloro, Dióxido de nitrogênio; - <u>Ácidos</u>: Sulfúrico, Hidroclórico, Fosfórico, Dióxido sulfuroso; - <u>Agentes oxidantes</u>: Peróxido de hidrogênio; - <u>Solventes</u>: Organosolv, Líquidos iônicos, Extração etanol-água, Extração benzeno-água. 	<ul style="list-style-type: none"> - Deslignificação; - Diminuição do grau de cristalinidade e de polimerização da celulose; - Hidrólise parcial ou completa da hemicelulose.
Físico-Químicos	<ul style="list-style-type: none"> - Explosão a vapor; - Hidrotérmico; - AFEX. 	<ul style="list-style-type: none"> - Deslignificação; - Diminuição do grau de cristalinidade e de polimerização da celulose; - Hidrólise parcial ou completa da hemicelulose.
Biológicos	<ul style="list-style-type: none"> - Bactérias; - Fungos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Deslignificação; - Redução do grau de polimerização da hemicelulose e celulose

Fonte: Adaptado de Taherzadeh e Karimi (2007).

Nota-se que a escolha do pré-tratamento definirá a composição da biomassa que será submetida à hidrólise e influenciará na formação de produtos de degradação, os quais apresentam efeitos negativos sobre as etapas seguintes na produção de E2G. Estes produtos de degradação que podem ser formados variam conforme o pré-tratamento utilizado, as condições do mesmo e a origem da biomassa (PRATTO, 2015).

A seguir estão descritos, de forma mais detalhada, alguns dos métodos de pré-tratamento apresentados na Tabela 2, que estão envolvidos no processo de produção de E2G.

2.3.1.1 Moagem de bolas

É um dos principais métodos físicos empregados na cominuição do material lignocelulósico, que consiste na utilização de um moinho de bolas composto por um tambor rotatório preenchido com inúmeras esferas em meio úmido ou seco. A biomassa é adicionada a este tambor onde encontram-se as esferas e pela rotação do tambor tem-se o cisalhamento da biomassa, resultando na redução de tamanho das partículas e de cristalinidade, aumentando a sacarificação da celulose (MORO, 2015).

As principais vantagens deste processo envolvem uma significativa redução da cristalinidade da biomassa e o aumento da área superficial, sem a formação de produtos de degradação. Não há necessidade da lavagem do material pré-tratado, diferentemente de alguns processos em que os efluentes precisam ser tratados. Contudo, estudos chegaram a demonstrar que o alto consumo energético requerido por este processo faz com que a moagem apresente um alto custo para ser implementada na produção de E2G, mesmo fato que acontece para outros métodos físicos (CARLY, 2011).

2.3.1.2 Explosão a vapor

O referido pré-tratamento é um dos principais métodos empregados no processamento de materiais lignocelulósicos. Também é conhecido por auto-hidrólise, resultado de sua capacidade de hidrolisar a hemicelulose e produzir açúcares e, no final do processo, haver a formação de correntes líquida (rica em hemicelulose) e sólida (composta essencialmente por lignina e celulose) (MORO, 2015). Para Corrêa (2016), este processo se destaca por ser um dos melhores e mais vantajosos na busca do aumento da susceptibilidade da biomassa lignocelulósica, por meio do rompimento das interações existentes entre os principais componentes.

Neste processo, a biomassa é submetida a um aquecimento rápido por vapor de alta pressão, podendo inicialmente realizar a moagem da biomassa para um maior rendimento do processo. Segundo Rabemanolontsoa e Saka (2016), são utilizadas pressões de 0,69 a 4,83 MPa com temperatura de 160 a 260 °C, por alguns minutos. Na sequência, realiza-se a descompressão da mistura biomassa/vapor, provocando uma brusca variação de temperatura que tem por finalidade causar a ruptura nas ligações da lignina, hemicelulose e celulose.

Neste método, dependendo das condições empregadas, pode-se formar produtos de degradação, como compostos fenólicos, furfural e HMF, oriundos da deterioração da lignina, pentoses e hexoses, respectivamente. O pré-tratamento por explosão a vapor pode ocorrer na presença de catalisadores químicos, resultando em um aumento no rendimento da hidrólise, já que, sem adição dos catalisadores o rendimento fica abaixo de 65%. No entanto, a presença destes catalisadores químicos, como CO₂, SO₂ e H₂SO₄, pode levar a formação de produtos de degradação e conseqüentemente, seria necessária uma etapa de neutralização após o pré-tratamento (BALAT et al., 2008).

Com base no exposto, observa-se que este processo é vantajoso em relação aos bons rendimentos de açúcares fermentescíveis, baixo consumo de energia, ausência de custos com o tratamento dos efluentes e não necessitar de moagem prévia da biomassa.

2.3.1.3 Alcalinos

Também chamado de básico, tem a capacidade de aumentar a acessibilidade à celulose por meio da solubilização da lignina e da hemicelulose presentes na biomassa, além de aumentar a área superficial da mesma. As bases mais empregadas são hidróxido de sódio, amônia e ureia (CORRÊA, 2016).

O hidróxido de sódio apresenta resultados mais efetivos dentre os agentes alcalinos, sendo usado para tratar diversos materiais lignocelulósicos. Este pré-tratamento com NaOH é caracterizado pela capacidade de remoção da lignina sem apresentar grandes efeitos nos demais componentes (BALAT et al., 2008).

A vantagem do pré-tratamento básico é o emprego de pressões e temperaturas amenas, além da degradação dos açúcares ser menos intensa quando comparada ao tratamento ácido. Já as desvantagens compreendem o longo tempo de residência, chegando a dias, e a necessidade de neutralização da corrente formada ao final do processo (MORO, 2015).

2.3.1.4 Biológicos

No pré-tratamento biológico utiliza-se microrganismos, principalmente fungos, que realizam a solubilização da lignina, a qual é removida da biomassa por meio da secreção das enzimas. Não há necessidade de adição de produtos químicos ou condições de elevadas temperaturas. A celulose fica mais acessível devido a remoção da lignina, favorecendo a etapa de hidrólise (MOOD et al., 2013).

É um método de baixo consumo energético, porém necessita-se de um longo tempo para desconstrução da biomassa, elevando o custo de implementação no processo produtivo do E2G em larga escala. A pouca experiência com este tipo de tratamento também é um fator negativo em sua utilização industrial (BALAT et al., 2008).

Os pré-tratamentos supracitados e diversos outros existentes, que não foram mencionados podem ser empregados também de forma combinada. Essa combinação de diferentes métodos possibilita aproveitar as vantagens e eliminar parcial ou por completo as dificuldades associadas a cada um (MOOD et al., 2013; MORO, 2015). Logo, a análise do rendimento fornecido pelo método escolhido e as desvantagens associadas devem ser estudadas para melhor escolha do pré-tratamento adequado ao processo implementado.

2.3.2 Hidrólise

Posterior a etapa de pré-tratamento, a biomassa lignocelulósica se torna mais susceptível ao processo de hidrólise que é responsável por converter os polissacarídeos (celulose e hemicelulose) presentes na biomassa celulósica em açúcares fermentescíveis (glicose e xilose), pela quebra das moléculas de carboidratos em unidades menores de açúcares (PRATTO, 2015; SAAD, 2010).

Existem três técnicas frequentemente empregadas na sacarificação dos polissacarídeos: hidrólise com ácido concentrado ou diluído e hidrólise enzimática. As condições operacionais de cada uma das referidas técnicas e seus desempenhos aproximados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições e desempenho das três técnicas de hidrólise.

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

Fonte: Hamelinck et al. (2005).

2.3.2.1 Hidrólise ácida

Na técnica que utiliza ácido concentrado, a hidrólise da celulose e hemicelulose presentes na biomassa é realizada por soluções de ácidos minerais fortes, como ácido sulfúrico, clorídrico ou fosfórico, empregados em baixas temperaturas. Neste processo, normalmente a hidrólise da fração de hemicelulose ocorre mais rapidamente que a fração celulósica, permitindo que os açúcares permaneçam expostos no meio reacional por muito tempo, causando a degradação e perda destes açúcares (OGEDA; PETRI, 2010).

A hidrólise realizada com ácido diluído envolve dois estágios, já que parte da hemicelulose e celulose são hidrolisadas separadamente. No primeiro estágio, pode-se remover a hemicelulose de modo a otimizar as condições de hidrólise tanto para celulose quanto para hemicelulose. No segundo estágio, é necessário utilizar altas temperaturas para otimização da hidrólise da fração celulósica, que proporciona a degradação de uma quantidade considerável de açúcares e resulta na inibição durante a etapa de fermentação (RABELO, 2010).

Portanto, as reações catalisadas por ácidos apresentam velocidades maiores que as reações catalisadas por enzimas, porém resultando em inconvenientes associados ao processo com ácidos, dos quais cita-se a utilização de equipamentos altamente resistentes à corrosão, recuperação do ácido e geração de compostos tóxicos e inibidores, prejudiciais à etapa de fermentação alcoólica (OGEDA; PETRI, 2010; PRATTO, 2015).

2.3.2.2 Hidrólise enzimática

Nesta técnica, a celulose é quebrada pela ação de enzimas celulolíticas, um processo relativamente lento, principalmente pela complexidade estrutural do substrato (biomassa), que possui lignina e hemicelulose não removidas no pré-tratamento, tornando difícil a acessibilidade à celulose. Além disso, a cristalinidade da celulose também é um obstáculo para as enzimas (BALAT et al., 2008; CORRÊA, 2016).

A hidrólise enzimática é um processo realizado em condições mais brandas que a hidrólise ácida, com pH entre 4,0 e 5,0 e temperaturas entre 40 e 50°C (condições de operação da enzima), apresentando rendimentos superiores à hidrólise ácida. Este processo não acarreta corrosão aos equipamentos (BALATA et al., 2008).

Atualmente o custo das enzimas reduziu substancialmente, principalmente pelo avanço da biotecnologia. Contudo, a aplicação da hidrólise enzimática em larga escala ainda encontra dificuldades técnicas e econômicas que podem ser superadas com a otimização deste processo, isto é, promover o aumento da carga de sólidos e a busca por enzimas mais eficientes, viabilizando a diminuição da quantidade de enzimas utilizadas e também a redução no tempo desta etapa (PITARELO, 2013).

A celulase, enzima responsável pela hidrólise enzimática, é um complexo enzimático composto por endoglucanases (EG) que hidrolisa as cadeias de celulose formando polissacarídeos de cadeias menores, exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) que, conseqüentemente, hidrolisam os terminais redutores da celulose e removem a celobiose, e β -glicosidades (BGL), que realizam a hidrólise da celobiose e de outros oligômeros à glicose. As celulases são produzidas por bactérias e fungos aeróbicos ou anaeróbicos, mesófilos ou termofílicos. A maior parte das celulases comerciais são produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei* e outra pequena parte produzida por *Aspergillus niger*, *Fusarium solani* e *Trichoderma viride*. Dentre as bactérias produtoras citam-se *Clostridium*, *Bacillus* e *Streptomyces* (CARLY, 2011; SILVA, 2015).

O complexo celulolítico tem efeito pela ação sinérgica das três enzimas supracitadas sobre a celulose e este sistema complexo de enzimas tem a necessidade de ser mantido estável para se ter uma atividade catalítica elevada. Devido a ação das enzimas endo e exoglucanases sobre a celulose obtém-se a celobiose e a glicose, sendo que a atividade das respectivas enzimas é inibida conforme ocorre o aumento da concentração dos produtos (celobiose e glicose) no meio reacional, resultando no declínio da taxa e do rendimento do processo de hidrólise. A celobiose formada apresenta um poder inibitório maior no complexo de enzimas celulolíticas do que a glicose (SILVA, 2015).

Os materiais lignocelulósicos são hidrolisados por ação enzimática basicamente em três etapas, primeiro ocorre a adsorção da enzima sobre a superfície do substrato, em seguida, tem-se a hidrólise da ligação glicosídica e por último, a dessorção das enzimas da superfície, retornando para o meio reacional (PITARELO, 2013).

Segundo Taherzadeh e Karimi (2007), a hidrólise enzimática é afetada por fatores como o tipo e concentração do substrato, concentração de enzimas, pré-tratamento empregado,

termoestabilidade das enzimas, tempo de reação, pH, agitação e inibição das enzimas. O experimento de hidrólise enzimática tem como característica uma fase logarítmica no início, devido à rápida liberação de açúcares solúveis no meio reacional. Em seguida, ocorre um declínio na produção de açúcares, que pode estar relacionado com inibição pelo produto, perda da enzima por adsorção à lignina ou inativação da mesma por inúmeros fatores, como temperatura ou força mecânica (CORRÊA, 2016).

Efeito da concentração de substrato

A concentração de substrato é um fator de grande influência sobre a hidrólise enzimática, já que altas cargas de sólidos atuam sobre a eficiência de mistura, além de afetar na cinética da reação e na resistência à transferência de massa. Estudos na literatura, como os trabalhos de Souza et al. (2014) e López-Linares (2014), mostram que altas concentrações de sólidos promoveram um aumento na concentração final de glicose, entretanto, a conversão da celulose a glicose diminuiu com o aumento da carga de substrato. Limitações de transferência de massa, devido à alta viscosidade do meio reacional, adsorção não eficaz e inibição pelo produto podem ser algumas das causas deste efeito (TAHERZADEH; KARIMI, 2007; CORRÊA, 2016).

Efeito da concentração de enzimas

De maneira geral, maiores concentrações de enzimas resultam no aumento da conversão final de celulose a glicose. No entanto, a relação entre a concentração de enzima e a conversão de celulose não é linear por toda faixa de carga de enzimas, a linearidade ocorre apenas nas medidas iniciais de velocidade da reação, ou seja, quando se tem velocidade constante de formação de produto. Sendo assim, é essencial estabelecer por meio de estudos da cinética enzimática, os limites de linearidade, permitindo a definição da máxima concentração de produto que ao ser retida no meio reacional não iniba a ação das enzimas, e resulte em velocidades de reação não lineares (PRATTO, 2015).

Mesa et al. (2010), não constataram diferença significativa na concentração final de glicose durante a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar empregando carga de enzimas de 15 e 25 FPU/g_{celulose}. Segundo Mussato et al. (2008), uma explicação provável para esse efeito da insignificância do aumento da carga de enzimas frente a obtenção de maiores concentrações de glicose é a inibição das enzimas pela elevada carga de produtos no meio (glicose e celobiose).

2.3.3 Fermentação

A transformação dos açúcares em compostos de interesse comercial é realizada por microrganismos, ou seja, a fermentação é um processo biológico. A utilização de biomassa celulósica para produção de etanol é dificultada pela escassez de microrganismos ideais que fermentem de forma eficiente pentoses e hexoses, simultaneamente. O processo fermentativo rentável depende das características do microrganismo utilizado, como do metabolismo e de suas limitações quanto a carga e tipo de substratos, produtividade, temperatura, pH, tempo de reação, tolerância à inibidores, dentre outras (SARKAR et al., 2012).

Os processos comumente empregados na fermentação do hidrolisado de matérias lignocelulósicas são a sacarificação e fermentação simultânea (SFS) e a hidrólise e fermentação separadas (HFS). O processo HFS tem sido o mais utilizado, porém o SFS apresenta maior produção de etanol, já que reduz a inibição promovida pelos produtos formados e elimina a necessidade da utilização de reatores separados para cada etapa. No entanto, o processo HFS ainda apresenta maior aplicação e viabilidade devido à dificuldade existente no processo SFS em empregar as condições ótimas de temperatura para as enzimas, responsáveis pela hidrólise, e para os microrganismos fermentadores. (SARKAR et al., 2012).

Dentre todas as leveduras e bactérias utilizadas na fermentação, a mais empregada é a *Saccharomyces cerevisiae*, porém esta levedura não é capaz de converter a xilose do hidrolisado. Sendo assim, a engenharia genética tem buscado o desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados, que permitam maior rendimento e ampla utilização de substratos (PITARELO, 2013).

2.3.4 Destilação

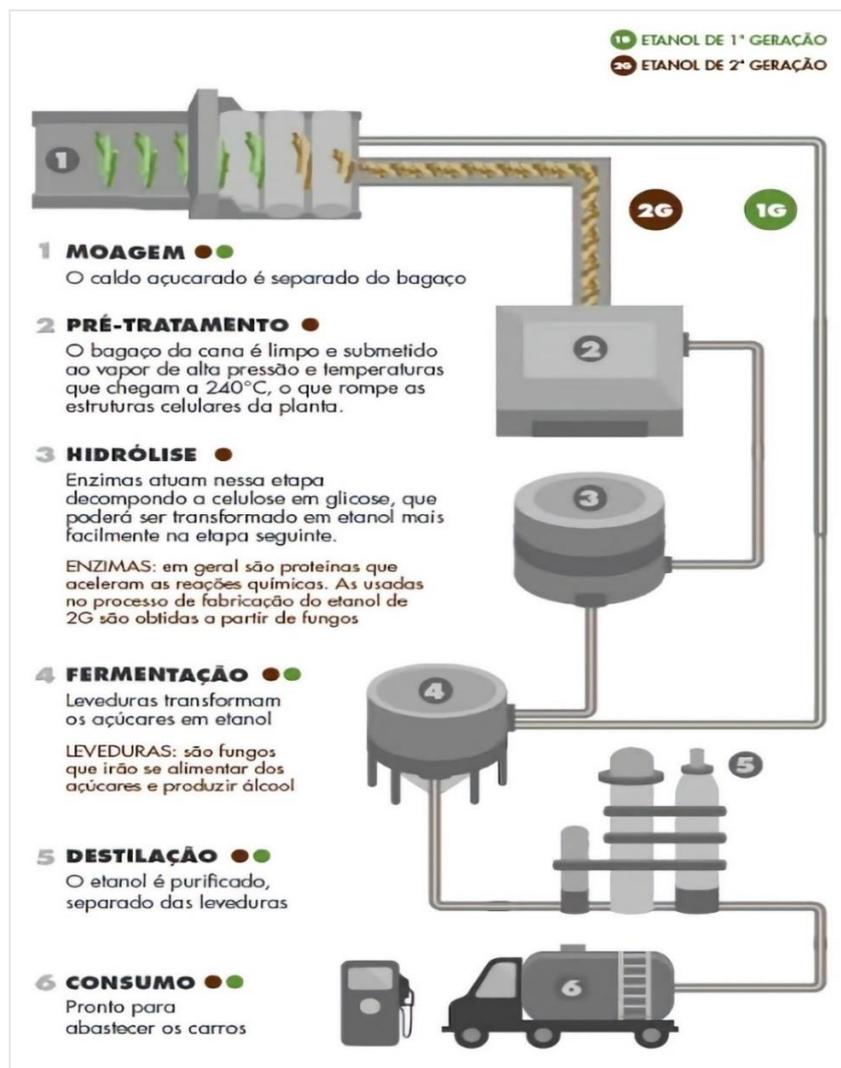
É o processo mais empregado nas indústrias químicas para promover a separação de componentes em uma mistura. O princípio utilizado é a diferença de volatilidade dos componentes, em que quanto maior for a diferença mais fácil será a separação (MARTINS, 2014; JARDIM, 2014).

Após a etapa de fermentação, é necessário o emprego de técnicas de separação, pois o etanol encontra-se diluído no vinho e precisa ser concentrado e purificado. Este vinho é composto majoritariamente por água e etanol, porém existe a presença de outros constituintes em menores quantidades. A fração volumétrica de etanol neste vinho é de 6 a 10 °GL (JARDIM, 2014).

O equipamento responsável pela destilação é denominado coluna de destilação, a qual é alimentada com o vinho proveniente da fermentação e ao final desta operação obtém-se o etanol hidratado, que é comercializado como combustível e deve apresentar um teor alcoólico mássico entre 95 e 96 °INPM (JARDIM, 2014; ANP, 2015).

Diante do exposto nesta seção, a respeito das etapas do processo produtivo para obtenção de E2G, o fluxograma completo deste processamento consiste basicamente nas quatro fases descritas nos tópicos supracitados, as quais são: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação. Este processo está esquematizado na Figura 5 como uma representação das fases da produção do etanol a partir da biomassa lignocelulósica (bagaço de cana-de-açúcar), considerando o pré-tratamento por explosão a vapor e a hidrólise enzimática. Na Figura 5, também se encontra as etapas de produção do E1G a partir da cana-de-açúcar.

Figura 5 - Processo produtivo do E1G a partir da cana e do E2G a partir do BCA.



Fonte: CNPEM (2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho compreendeu no estudo da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo método de explosão a vapor. Nesta seção, estão detalhados os materiais e a metodologia empregada na avaliação das diferentes condições operacionais de hidrólise enzimática, além disso, encontra-se a descrição da etapa de quantificação da glicose (produto de interesse) formada na hidrólise pela ação das enzimas. Foram avaliadas diferentes condições de concentração de sólidos e enzimas, selecionando a melhor de acordo com a concentração final de glicose e a produtividade obtida, além da avaliação de outros fatores relevantes para o processo produtivo em larga escala.

3.1 Materiais

Na realização dos experimentos foi utilizado o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo método de explosão a vapor, cedido gentilmente pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC – Piracicaba, SP).

Para realização dos ensaios de hidrólise enzimática foi utilizado o complexo enzimático comercial Cellic Ctec 2, doado pela *Novozymes Latin America* – Araucária, PR.

3.2 Determinação da umidade do bagaço de cana-de-açúcar

A determinação do teor de umidade presente no bagaço de cana-de-açúcar (BCA) foi realizado por meio de uma balança de determinação de umidade (Termo balança, modelo i-Thermo 163L) operada no modo automático. Foi pesado no equipamento em torno de 1,5 g da amostra (BCA úmido), que foi seca até obtenção de peso constante. Este modelo de equipamento utilizado apresenta uma precisão de $\pm 0,01$ (% umidade).

3.3 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática do BCA pré-tratado por explosão a vapor, foi realizada em meio contendo tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) em um volume reacional de 50 mL. Para determinação das massas de ácido cítrico e citrato de sódio necessárias para obtenção de 500 mL de solução tampão citrato nas condições exigidas de molaridade e pH foi utilizado a plataforma *Citrate Buffer* (pH 3.0 to 6.2) *recipe and preparation* da AAT Bioquest. Após obter os valores das massas, as mesmas foram pesadas em béqueres e foi utilizado água destilada para realizar a mistura em balão volumétrico de 500 mL, que teve o volume completado com água destilada.

As concentrações de sólidos (BCA) avaliadas foram de 5, 10 e 20% (m/v), e de enzimas 5, 10 e 20 FPU/g_{BCA}. Portanto, foram avaliadas nove condições operacionais.

Todos os experimentos foram realizados em frascos de 250 mL, com volume reacional de 50 mL, sendo assim, para obtenção do volume reacional foram calculados o volume de solução tampão, de enzimas e de água contidos na massa de BCA, por meio da umidade do mesmo. Os frascos contendo as amostras foram colocados em incubadora de bancada com agitação orbital (Quimis, modelo 0816M22) a 150 rpm, com temperatura controlada a 50 °C. Foram retiradas amostras de 1 mL para quantificação da concentração de glicose nos tempos de 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 24, 33 e 48 h. Estas amostras foram colocadas em microtubos devidamente identificados, posteriormente centrifugados (centrífuga refrigerada Novatecnica, modelo NT 825) por 7 minutos, com rotação de 4.000 rpm a 25 °C. Após isto, coletou-se o sobrenadante de cada amostra e transferiu-o para outros microtubos, que foram armazenados imediatamente no freezer até a realização da quantificação de açúcares, objetivando a inativação enzimática.

3.4 Preparo do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Para o preparo do reagente DNS foi utilizada a metodologia descrita por Vasconcelos et al. (2013). Inicialmente foi dissolvido 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 200 mL de solução 2 M de NaOH (solução A). Pesou-se 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio (TDSP) e misturou-o em 500 mL de água destilada (solução B), esta mistura foi aquecida e agitada até completa dissolução. Mantidas as condições de aquecimento e agitação, adicionou-se a solução A sobre a B. Após completa dissolução do DNS, foi esperado o resfriamento da mistura e realizada a transferência desta para um balão volumétrico de 1 L, que foi completado o volume com água destilada.

Após a utilização do reagente DNS, este foi transferido para um frasco de vidro âmbar, etiquetado, datado e posteriormente armazenado em um refrigerador.

3.5 Curva padrão de glicose

Para construção da curva analítica do padrão de glicose frente ao reagente DNS, utilizada posteriormente na quantificação das amostras da hidrólise enzimática, foram separados cinco balões volumétricos de 100 mL, os quais foram nomeados de acordo com sua respectiva diluição. Foram pesadas nessa ordem, 0,1 g, 0,08 g, 0,06 g, 0,04 g e 0,02 g de glicose e adicionadas aos balões volumétricos, que por sua vez tiveram seus volumes completados com

água destilada. Então, foram obtidas respectivamente as concentrações de 1 g/L, 0,8 g/L, 0,6 g/L, 0,4 g/L e 0,2 g/L, gramas de glicose por litro de solução.

Foram utilizados tubos de ensaio para adição de 1 mL de solução de glicose mais 1 mL de reagente DNS, os tubos foram levados para banho maria (modelo HH-S18, Warmnest) a 100 °C por 5 min. Após este tempo, os tubos de ensaio foram colocados em água ambiente para promover o resfriamento e, na sequência, foi adicionado 10 mL de água destilada em cada tubo, realizando a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP-22) a 540 nm. Também foi realizada a amostra de calibração (branco), que consiste na adição de água destilada no lugar da solução de glicose, submetendo esta amostra ao mesmo processamento das demais.

Foram obtidos dados de absorbância para cada concentração de glicose e por meio destes dados foi ajustado uma reta, que possibilita o cálculo da concentração de glicose de uma amostra por meio do dado de absorbância obtido no espectrofotômetro.

3.6 Quantificação de açúcares redutores

Para a quantificação dos açúcares redutores totais, foi empregado o método proposto por Miller (1959), utilizando o reagente DNS. Este método possibilita a quantificação dos açúcares redutores totais, como glicose, maltose, frutose e lactose, açúcares que possuem grupos carbonílicos e cetônicos livres, que em solução alcalina formam algum aldeído, característica que os definem como redutores.

Este método de quantificação fundamenta-se na capacidade do ácido 3,5-dinitrosalicílico ser reduzido pelos açúcares redutores a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico e simultaneamente o carbono carbonílico do açúcar sofrer oxidação a um grupo carboxílico. Portanto, ao misturar o reagente DNS com uma solução contendo açúcares redutores, tem-se a redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico presente neste reagente, ocasionando alteração na cor da solução. Inicialmente o reagente DNS apresenta uma coloração alaranjada que após a redução produz diferentes tonalidades de laranja avermelhado, cuja absorção máxima de luz se dá no comprimento de onda de 540 nm.

As amostras provenientes da hidrólise enzimática foram retiradas do freezer para quantificação de glicose. Foram coletadas alíquotas de diferentes volumes das amostras a fim de adequar a diluição necessária para leitura no espectro, determinada pela curva padrão de glicose. As alíquotas de amostra foram adicionadas a tubos de ensaio, devidamente identificados, que também receberam um volume de água destilada necessário para promover a diluição adequada. Os tubos de ensaio contendo a mistura de água destilada e amostra

receberam a adição de 1 mL do reagente DNS e foram levados para banho maria (Warmnest, modelo HH-S18) a 100 °C por 5 min, condição responsável pela desativação da enzima. Após este tempo, os tubos foram colocados em água a temperatura ambiente para resfriamento e posteriormente foi adicionado 10 mL de água destilada a cada tubo de ensaio, realizando a leitura no espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP-22) na intensidade de 540 nm. Também foi feito o branco, constituído por 1 mL de água destilada mais 1 mL de reagente DNS, submetido às mesmas condições de processo das amostras.

A quantificação das amostras resultou em dados de absorbância que foram convertidos para concentração de glicose por meio da equação da reta ajustada para a curva padrão de glicose e as respectivas diluições empregadas em cada amostra.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na sequência estão apresentados os resultados referentes as nove condições operacionais empregadas na hidrólise enzimática do BCA pré-tratado por explosão a vapor. As condições estudadas neste trabalho foram analisadas em termos da concentração final de glicose presentes no hidrolisado e da produtividade de glicose ao longo do tempo de hidrólise do bagaço explodido.

4.1 Determinação da umidade

As amostras utilizadas de BCA pré-tratado por explosão a vapor apresentaram um teor de umidade de $61,97 \pm 0,68\%$.

O teor de umidade da biomassa tem efeito direto no rendimento da etapa de hidrólise enzimática, como constatado por Pitarelo et al. (2012) na avaliação do efeito do teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar sobre as etapas de pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática do bagaço de cana. Os referidos autores obtiveram resultados que demonstraram a queda do rendimento na hidrólise enzimática para maiores teores de umidade do bagaço de cana.

4.2 Caracterização química da biomassa

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado no presente trabalho foi proveniente do mesmo lote doado pelo CTC – Piracicaba para o trabalho de Corrêa (2016). Desta forma, em seu trabalho, o referido autor realizou a caracterização química do bagaço explodido a vapor, utilizando a metodologia apresentada e validade por Gouveia et al. (2009). Os resultados obtidos na caracterização química do bagaço explodido encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização química do bagaço explodido.

Componentes	Composição (%)
Celulose	$43,16 \pm 0,10$
Hemicelulose	$12,44 \pm 0,14$
Lignina	$34,54 \pm 1,99$
Total	$90,14 \pm 2,02$

Fonte: Corrêa (2016).

Nos resultados apresentados na Tabela 4 não constam as substâncias extrativas e não-extrativas, uma vez que as mesmas não foram quantificadas, sendo obtido apenas os teores dos

constituintes majoritários, celulose, hemicelulose e lignina, que resultaram em valores coerentes com os encontrados em trabalhos na literatura. Gouveia et al. (2009) na caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar, encontraram 47,7% de celulose; 8,90% de hemicelulose; e 34,3% de lignina.

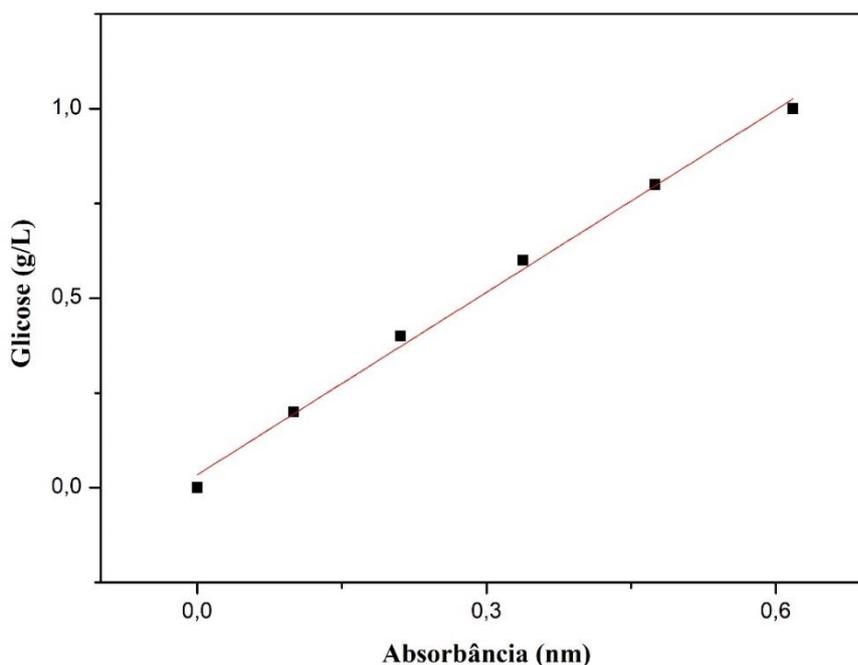
4.3 Atividade enzimática

A determinação da atividade do complexo enzimático Cellic Ctec 2 foi baseada na metodologia proposta por Ghose (1987) e realizada no trabalho de Corrêa (2016). Os resultados obtidos por Corrêa (2016) podem ser utilizados neste trabalho pois o complexo enzimático empregado para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pertence ao mesmo lote doado pela *Novozymes Latin America* (Araucária, PR) para o trabalho do referido autor. Foi obtida uma atividade média de unidade de papel filtro de 241 FPU/mL.

4.4 Obtenção da curva padrão de glicose

O método DNS é apresentado na literatura como um método confiável e com uma sensibilidade de detecção de 1 a 20 μmol de glicose (MILLER, 1959). Este método apresenta desvios mínimos e um alto grau de linearidade, como está representado na curva analítica experimental obtida (Figura 6).

Figura 6 - Curva analítica padrão de glicose.



Fonte: Do autor (2019).

Por meio dos dados obtidos de absorvância para cada concentração de glicose, foi possível o ajuste linear pelo *software* OriginPro 8, como pode ser observado no gráfico da Figura 6. Então, deste ajuste linear foi obtida a Equação 1, cujo coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,9943. Este coeficiente é uma medida da proporção de resposta de uma variável em relação a outra, de maneira que quanto mais próximo de 1 mais representativo será o ajuste aos dados amostrais.

$$y = 1,6049x + 0,0341 \quad (1)$$

Portanto, a Equação 1, proveniente da curva analítica experimental, representa a proporção da concentração de glicose (y) em relação a absorvância (x). Esta equação, foi empregada para quantificar o conteúdo de glicose presente nas amostras oriundas da hidrólise enzimática do bagaço explodido.

4.5 Quantificação de glicose

O teor de glicose resultante da etapa de hidrólise enzimática para as diferentes condições operacionais avaliadas neste trabalho foi quantificado pelo método DNS, viabilizando assim a obtenção do perfil de concentração de glicose ao longo do tempo de hidrólise. Além disso, foi possível realizar o cálculo da produtividade de glicose, fornecendo também o perfil da produtividade ao longo do tempo.

4.5.1 Concentração de glicose

As Tabelas 5, 6 e 7 apresentam os valores de concentração de glicose durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar empregando carga enzimática de 5 FPU/g_{BCA} e 5, 10 e 20% (m/v) de carga de sólidos, respectivamente. Também estão expostos nas tabelas os valores da média e do desvio padrão entre as medidas.

Tabela 5 - Concentração de glicose para a configuração de 5 FPU/g_{BCA} e 5% de sólidos.

Tempo (h)	Glicose₁ (g/L)	Glicose₂ (g/L)	Média (g/L)	Desvio
0	0,000	0,000	0,000	0,000
0,5	13,365	9,979	11,672	2,394
1	11,188	16,105	13,647	3,477
2	12,075	15,702	13,888	2,565
3	13,284	19,329	16,307	4,275
4	13,203	21,103	17,153	5,586
6	14,735	20,538	17,637	4,104
8	16,266	19,410	17,838	2,223
9	20,297	17,475	18,886	1,995
24	18,040	22,634	20,337	3,249
33	27,954	31,662	29,808	2,622
48	33,194	39,158	36,176	4,218

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 6 - Concentração de glicose para a configuração de 5 FPU/g_{BCA} e 10% de sólidos.

Tempo (h)	Glicose₁ (g/L)	Glicose₂ (g/L)	Média (g/L)	Desvio
0	0,000	0,000	0,000	0,000
0,5	24,005	13,445	18,725	7,467
1	20,458	18,604	19,531	1,311
2	17,717	21,748	19,732	2,850
3	23,360	22,231	22,795	0,798
4	27,390	28,921	28,156	1,083
6	23,118	25,617	24,367	1,767
8	29,486	27,793	28,639	1,197
9	41,899	42,463	42,181	0,399
24	55,441	46,655	51,048	6,213
33	48,509	53,990	51,249	3,876
48	49,299	64,453	56,876	10,715

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 7 - Concentração de glicose para a configuração de 5 FPU/g_{BCA} e 20% de sólidos.

Tempo (h)	Glicose₁ (g/L)	Glicose₂ (g/L)	Média (g/L)	Desvio
0	0,000	0,000	0,000	0,000
0,5	29,470	38,659	34,064	6,498
1	33,339	41,722	37,530	5,928
2	51,394	47,848	49,621	2,508
3	60,745	49,299	55,022	8,094
4	50,427	66,710	58,568	11,513
6	78,801	55,425	67,113	16,529
8	70,256	75,576	72,916	3,762
9	96,534	81,058	88,796	10,943
24	92,504	76,544	84,524	11,285
33	96,695	95,083	95,889	1,140

Fonte: Do autor (2019).

A concentração de glicose para cada medida e em cada ponto foi calculada por meio da Equação 1, proveniente da curva padrão de glicose. A realização da leitura no espectrofotômetro, em intensidade de 540 nm, exigiu a diluição das amostras para que os valores lidos de absorvância permanecessem dentro da faixa estabelecida pela curva padrão de glicose. Logo, no cálculo da concentração também foi realizado a multiplicação do valor obtido através da Equação 1 pela diluição empregada na respectiva amostra.

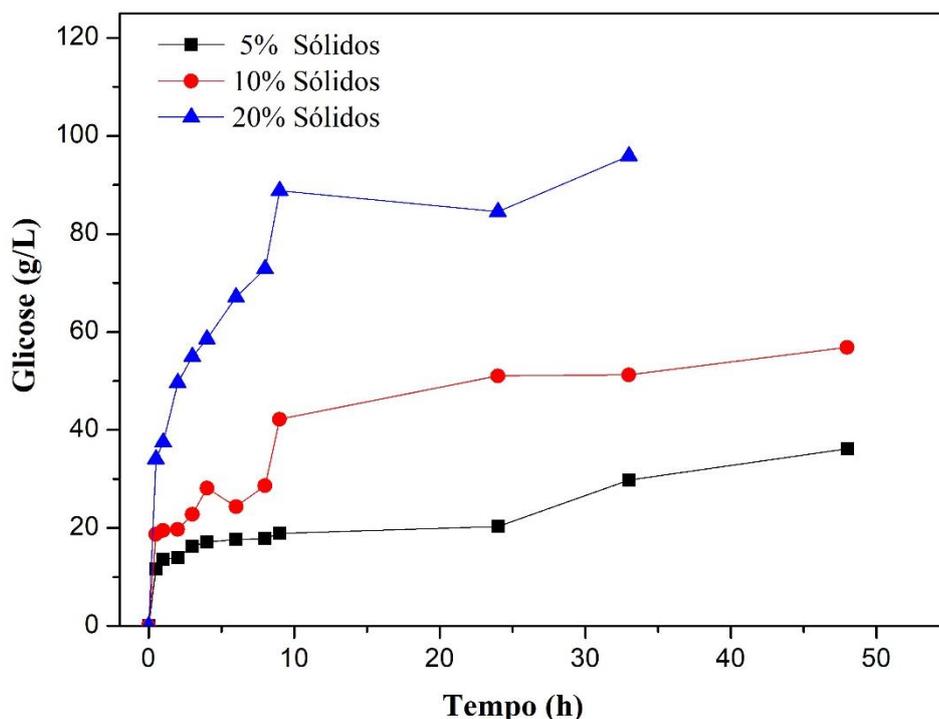
Os ensaios foram realizados em duplicata para diminuir os erros experimentais, aumentando a segurança dos resultados obtidos, porém observa-se que os valores de desvio padrão para algumas das medidas foram muito altos, o que indica maior discrepância entre as medidas da duplicata. Esta divergência nas medidas pode ser devido a sensibilidade do método de quantificação empregado, método DNS, pois foram utilizados fatores de diluição acima de 50 vezes, que podem ter acarretado imprecisão na quantificação de glicose.

Pode-se observar a partir dos valores apresentados nas Tabelas 5, 6 e 7, que para cada condição operacional empregada a concentração de glicose aumentou ao longo do tempo de hidrólise enzimática, atingindo em 48 h, para a carga enzimática de 5 FPU/g_{BCA}, os valores de $36,176 \pm 4,218$ g/L e $56,876 \pm 10,715$ g/L com 5 e 10% de carga de sólidos, respectivamente. Já para 20% de carga de sólidos foi obtido o valor de $95,889 \pm 1,140$ g/L em 33 h de hidrólise. Nesta condição não foi possível realizar a coleta de hidrolisado no tempo de 48 h, pois o meio reacional não continha mais líquido suficiente para a coleta.

Então, nota-se que o aumento na carga de sólidos proporcionou a obtenção de maiores concentrações de glicose ao final da etapa de hidrólise, sendo possível a melhor visualização

deste comportamento observado por meio da Figura 7, na qual encontra-se um gráfico dos perfis de concentração de glicose ao longo do tempo de hidrólise enzimática para as três condições operacionais avaliadas.

Figura 7 - Perfil de concentração de glicose em g/L em função do tempo de hidrólise para as cargas de 5, 10 e 20% de sólidos e carga de enzima de 5 FPU/g_{BCA}.



Fonte: Do autor (2019).

Os perfis de concentração ratificam a relação entre a carga de sólidos e a concentração de glicose, como pode-se observar que a carga de sólidos de 20% resultou nas maiores concentrações de glicose, superiores às concentrações obtidas para as cargas de 10% e 5% de sólidos, respectivamente. O comportamento apresentado para as três condições foi coerente com o esperado, visto que maiores concentrações de sólidos implicam em maiores quantidades de celulose disponível para ser convertida a glicose pela ação das enzimas na etapa de hidrólise. Resultados semelhantes foram obtidos por Souza et al. (2014) na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar empregando uma carga de enzimas de 20 FPU/g_{celulose} e cargas de sólidos de 10, 15 e 20%.

A Figura 7 também permitiu a visualização de uma característica típica da hidrólise enzimática, que consiste em um rápido aumento da concentração de glicose no início do processo até 9 h de reação, consequência da alta liberação de açúcares solúveis no meio

reacional. Também pode-se notar a influência da carga de sólidos na velocidade inicial da reação, dado que para a carga de 20% de sólidos os valores de concentração atingidos até 9 h de reação são superiores às demais condições avaliadas.

Nas Tabelas 8, 9 e 10, encontram-se os valores de concentração de glicose no decorrer da hidrólise enzimática para a condição operacional que foi empregado 10 FPU/g_{BCA} como carga de enzimas e 5, 10 e 20% (m/v) de carga de sólidos, nessa ordem. Estes experimentos também foram realizados em duplicata.

Tabela 8 - Concentração de glicose para a configuração de 10 FPU/g_{BCA} e 5% de sólidos.

Tempo (h)	Glicose₁ (g/L)	Glicose₂ (g/L)	Média (g/L)	Desvio
0	0,000	0,000	0,000	0,000
0,5	6,755	6,029	6,392	0,513
1	8,286	8,851	8,568	0,399
2	13,606	5,949	9,778	5,415
3	20,861	18,846	19,853	1,425
4	18,765	23,843	21,304	3,591
6	22,634	20,216	21,425	1,710
8	21,103	24,569	22,836	2,451
9	29,808	30,453	30,131	0,456
24	36,740	42,947	39,844	4,389
33	46,735	37,546	42,141	6,498
48	38,594	46,171	42,383	5,358

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 9 - Concentração de glicose para a configuração de 10 FPU/g_{BCA} e 10% de sólidos.

Tempo (h)	Glicose₁ (g/L)	Glicose₂ (g/L)	Média (g/L)	Desvio
0	0,000	0,000	0,000	0,000
0,5	27,374	18,668	23,021	6,156
1	30,437	19,313	24,875	7,866
2	31,888	26,890	29,389	3,534
3	29,792	32,855	31,324	2,166
4	40,271	39,787	40,029	0,342
6	47,203	46,074	46,639	0,798
8	65,098	39,626	52,362	18,011
9	39,787	65,259	52,523	18,011
24	83,637	64,130	73,884	13,793
33	83,637	74,125	78,881	6,726
48	95,728	107,658	101,693	8,436

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 10 - Concentração de glicose para a configuração de 10 FPU/g_{BCA} e 20% de sólidos.

Tempo (h)	Glicose₁ (g/L)	Glicose₂ (g/L)	Média (g/L)	Desvio
0	0,000	0,000	0,000	0,000
0,5	33,613	35,023	34,318	0,997
1	67,669	51,346	59,507	11,542
2	64,042	66,661	65,351	1,852
3	69,483	61,825	65,654	5,415
4	59,810	73,311	66,561	9,547
6	77,342	73,311	75,326	2,850
8	83,186	78,148	80,667	3,562
9	83,387	78,551	80,969	3,420
24	101,120	96,284	98,702	3,420
33	119,861	102,733	111,297	12,112
48	129,736	96,687	113,211	23,369

Fonte: Do autor (2019).

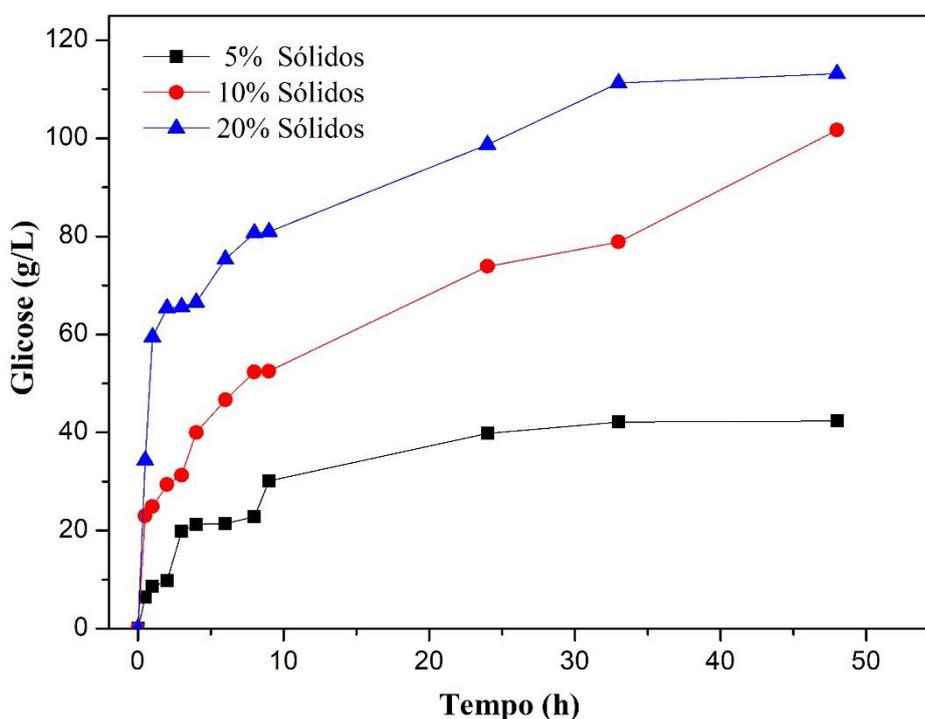
As concentrações de glicose apresentadas nas Tabelas 8, 9 e 10 para as três condições operacionais em que foi empregado a carga de enzimas de 10 FPU/g_{BCA} e 5, 10 e 20% de carga de sólidos, respectivamente, também foram calculadas por meio da Equação 1. Os procedimentos para leitura da absorbância das amostras no espectrofotômetro e para o cálculo da concentração de glicose ao longo da hidrólise enzimática seguiram o mesmo método utilizado para as condições operacionais anteriores com carga enzimática de 5 FPU/g_{BCA}.

Os desvios observados na quinta coluna das tabelas 8, 9 e 10, são superiores em sua maioria aos valores obtidos para as condições de 5 FPU/g_{BCA} variando a carga de sólidos, constatando a possibilidade da influência da diluição na precisão do método DNS, já que para 10 FPU/g_{BCA} foram necessárias maiores fatores de diluição para permitir a realização das leituras no espectro, em intensidade de 540 nm. Outras prováveis fontes de erros na quantificação de glicose por DNS são devido à má calibração do espectrofotômetro e a utilização de cubetas com ranhuras, diminuindo a precisão das leituras realizadas.

Os valores contidos nas Tabelas 8, 9 e 10, demonstram que para cada condição operacional empregada a concentração de glicose também aumentou ao longo do tempo de hidrólise enzimática, atingindo em 48 h, para a carga enzimática de 10 FPU/g_{BCA}, os valores de $42,383 \pm 5,358$ g/L; $101,693 \pm 8,436$ g/L; e $113,211 \pm 23,369$ g/L com 5, 10 e 20% de carga de sólidos, respectivamente. Nota-se que os valores obtidos de concentração de glicose ao final da hidrólise enzimática para a carga de enzimas de 10 FPU/g_{BCA} foram superiores aos alcançados com carga enzimática de 5 FPU/g_{BCA}.

Portanto, o mesmo comportamento observado para as três condições com carga de enzimas de 5 FPU/g_{BCA}, foi observado também para 10 FPU/g_{BCA}, onde a concentração final de glicose aumentou com o aumento da quantidade de sólidos. Os perfis de concentração de glicose ao longo da hidrólise enzimática, Figura 8, também foram plotados para melhor visualização do comportamento apresentado diante da variação na concentração de sólidos.

Figura 8 - Perfil de concentração de glicose em g/L em função do tempo de hidrólise para as cargas de 5, 10 e 20% de sólidos e carga de enzima de 10 FPU/g_{BCA}.



Fonte: Do autor (2019).

O gráfico apresentado na Figura 8 reforça a relação entre a carga de sólidos e a concentração de glicose, em que para maiores quantidades de sólidos foi possível alcançar concentrações finais de glicose mais altas, mesmo comportamento apresentado quando foi avaliado 5 FPU/g_{BCA} como carga de enzimas.

O rápido aumento da concentração de glicose no início do processo até 9 h de reação, característica inerente à hidrólise enzimática, também é observado para estas condições operacionais. Além disso, para a carga de 20% de sólidos os valores de concentração atingidos em 48 h de reação são superiores às demais condições avaliadas, confirmando a influência da carga de sólidos na concentração final de glicose, como observado também por Souza et al (2014) com bagaço de cana e López-Linares et al. (2014) com palha de colza.

As Tabelas 8, 9 e 10 apresentam os valores obtidos de concentração de glicose para as últimas três condições operacionais de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar avaliadas. Nestas condições foi empregado a carga enzimática de 20 FPU/g_{BCA} e 5, 10 e 20% (m/v) de carga de sólidos, na devida ordem. A realização desses experimentos também foi em duplicata.

Tabela 11 - Concentração de glicose para a configuração de 20 FPU/g_{BCA} e 5% de sólidos.

Tempo (h)	Glicose₁ (g/L)	Glicose₂ (g/L)	Média (g/L)	Desvio
0	0,000	0,000	0,000	0,000
0,5	11,245	14,872	13,058	2,565
1	24,142	22,731	23,436	0,997
2	18,701	35,225	26,963	11,684
3	18,902	40,867	29,885	15,532
4	41,472	33,613	37,542	5,557
6	50,742	40,263	45,502	7,410
8	56,384	43,286	49,835	9,262
9	37,643	66,258	51,951	20,234
24	84,193	39,860	62,026	31,348
33	57,190	76,334	66,762	13,537
48	75,729	68,273	72,001	5,272

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 12 - Concentração de glicose para a configuração de 20 FPU/g_{BCA} e 10% de sólidos.

Tempo (h)	Glicose₁ (g/L)	Glicose₂ (g/L)	Média (g/L)	Desvio
0	0,000	0,000	0,000	0,000
0,5	62,833	54,167	58,500	6,127
1	72,908	57,392	65,150	10,972
2	50,742	84,395	67,568	23,796
3	82,984	73,916	78,450	6,412
4	79,760	86,007	82,883	4,417
6	75,125	90,239	82,682	10,687
8	95,680	105,554	100,617	6,982
9	109,181	91,649	100,415	12,397
24	118,048	111,196	114,622	4,845
33	104,345	124,899	114,622	14,534
48	121,154	123,863	122,508	1,915

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 13 - Concentração de glicose para a configuração de 20 FPU/g_{BCA} e 20% de sólidos.

Tempo (h)	Glicose₁ (g/L)	Glicose₂ (g/L)	Média (g/L)	Desvio
0	0,000	0,000	0,000	0,000
0,5	74,435	60,667	67,551	9,735
1	83,237	55,476	69,357	19,630
2	73,758	76,466	75,112	1,915
3	69,470	91,588	80,529	15,640
4	65,633	101,067	83,350	25,056
6	70,824	94,071	82,447	16,438
8	99,262	97,456	98,359	1,277
9	114,609	87,977	101,293	18,832
24	106,710	119,349	113,029	8,937
33	134,922	118,897	126,910	11,331
48	132,665	143,047	137,856	7,341

Fonte: Do autor (2019).

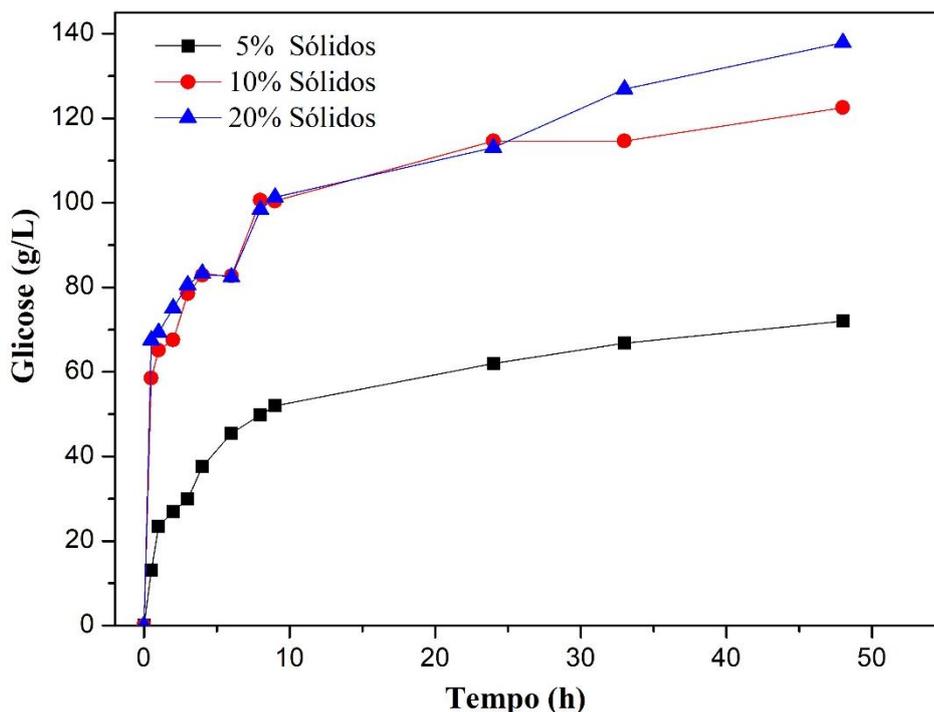
O cálculo da concentração de glicose ao longo da hidrólise enzimática para estas últimas condições operacionais apresentadas nas Tabelas 11, 12 e 13, também foi realizado por meio da Equação 1. A leitura da absorbância das amostras, do mesmo modo que para as outras condições, exigiu a diluição adequada das amostras, conseqüentemente os valores de concentração obtidos por meio da Equação 1 foram multiplicados pelo fator de diluição da respectiva amostra avaliada.

Os valores de desvio obtidos para estas três condições operacionais com carga de enzimas de 20 FPU/g_{BCA} foram geralmente maiores que para as condições com cargas enzimáticas de 5 e 10 FPU/g_{BCA}, reafirmando a hipótese da influência da diluição na quantificação de glicose, posto que, nestas últimas condições com maior carga enzimática foram empregados maiores fatores de diluição para enquadrar os valores de absorbância no limite determinado pela curva padrão de glicose. Além das fontes descritas de erro nas demais condições, outra possível fonte que acarretou os valores mais altos de desvio para todos os ensaios foi a coleta do sobrenadante após a centrifugação das amostras, pois a centrifugação pode ter sido ineficiente permitindo a coleta de sólidos juntamente com o hidrolisado, ocasionando na ação das enzimas no intervalo que as amostras estiveram fora do freezer e também interferindo na leitura da absorbância.

Os resultados contidos nas Tabelas 8, 9 e 10, indicam que a concentração final de glicose também aumentou com o aumento da carga de sólidos ao longo da hidrólise enzimática. Em 48 h as concentrações de glicose obtida para a carga enzimática de 20 FPU/g_{BCA}, foram de 72,001

$\pm 5,272$ g/L; $122,508 \pm 1,915$ g/L; e $137,856 \pm 7,341$ g/L com carga de sólidos de 5, 10 e 20%, respectivamente. Na Figura 9, estão ilustrados os perfis de concentração de glicose para as três condições operacionais supracitadas, permitindo a melhor visualização do comportamento resultante do aumento da concentração de sólidos para carga de enzimas de 20 FPU/g_{BCA}.

Figura 9 - Perfil de concentração de glicose em g/L em função do tempo de hidrólise para a cargas de 5, 10 e 20% de sólidos e carga de enzima de 20 FPU/g_{BCA}.



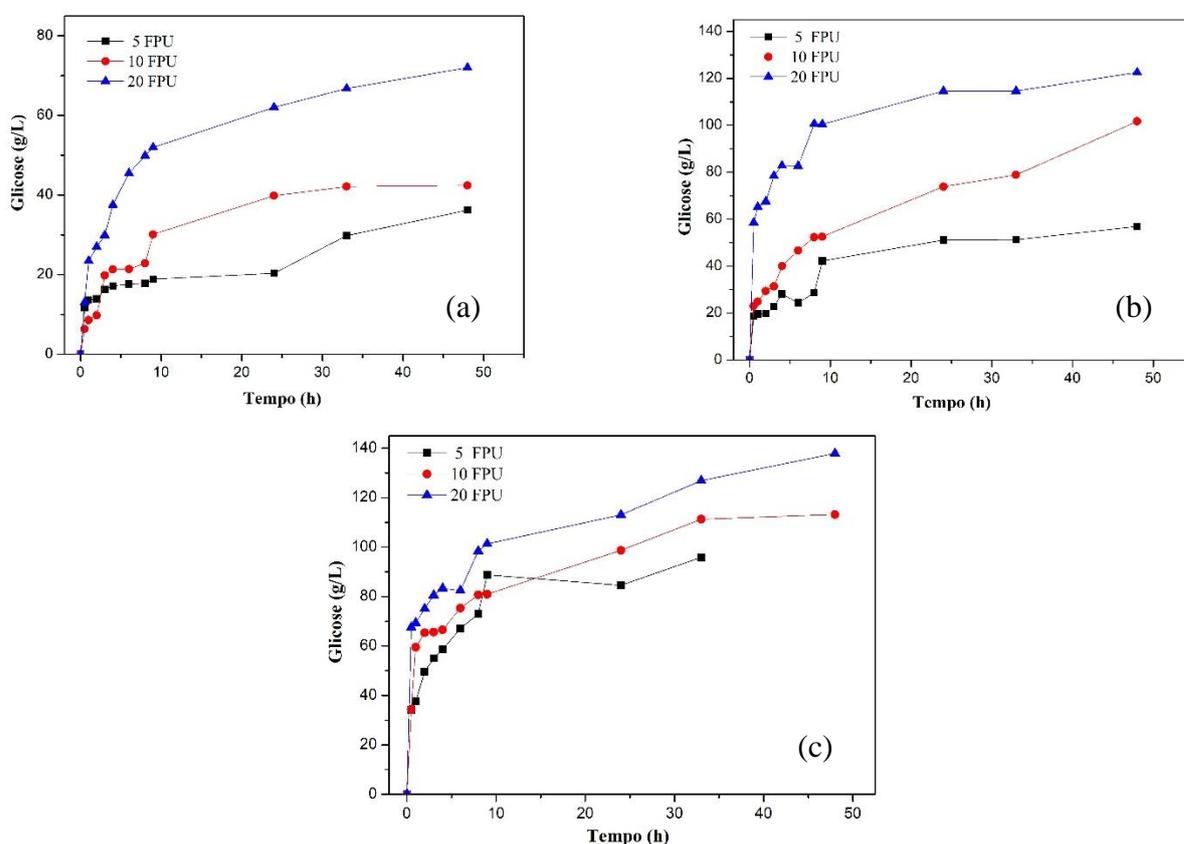
Fonte: Do autor (2019).

Observa-se na Figura 9 um comportamento similar ao obtido para as seis condições operacionais já avaliadas, com carga de enzimas de 5 e 10 FPU/g_{BCA}, em que se nota uma proporcionalidade na relação entre a carga de sólidos e a concentração de glicose, diferindo apenas na proximidade das concentrações de glicose ao longo da hidrólise para as cargas de sólidos de 10 e 20%. Ademais, o comportamento inicial da reação até as 9 h de processo também foi condizente com a característica típica da hidrólise enzimática, que corresponde a um rápido aumento da concentração de glicose no meio reacional.

Pratto (2015), avaliou a hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar com diferentes cargas de sólidos e os resultados demonstraram que o aumento da concentração de sólidos resulta no aumento da velocidade inicial da reação. Comportamento similar foi observado para as nove condições operacionais avaliadas neste trabalho.

Os resultados obtidos para as condições estudadas, com carga de enzimas de 5, 10 e 20 FPU/g_{BCA} e cargas de sólidos de 5, 10 e 20%, permitem concluir que o aumento da carga de sólidos resulta no aumento da concentração final de glicose, como constatado por Souza et al. (2014) e Corrêa (2016) na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Além disso, a carga de enzimas também proporcionou a obtenção de concentrações mais elevadas de glicose, fato que pode ser melhor visualizado na Figura 10, na qual estão apresentados os gráficos dos perfis de concentração de glicose, em 48 h de hidrólise, para as cargas de sólidos de 5, 10 e 20%, variando a carga de enzimas em 5 (Figura 10 - a), 10 (Figura 10 - b) e 20 (Figura 10 - c) FPU/g_{BCA}.

Figura 10 - Perfil de concentração de glicose ao longo da hidrólise para cargas de sólidos de (a) 5, (b) 10 e (c) 20% com carga enzimática de 5, 10 e 20 FPU/g_{BCA}.



Fonte: Do autor (2019).

Os resultados obtidos demonstram que o aumento da carga de enzimas também promoveu maior liberação de glicose, como observado por Rabelo (2010) na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e Mendes et al. (2012) com *Brachiaria brizantha*. Ademais, os resultados também demonstram que a velocidade inicial da reação aumentou com maiores cargas

de enzimas, em concordância com os resultados obtidos nos estudos realizados por Pratto (2015) com palha de cana-de-açúcar.

No entanto, para otimizar e aumentar efetivamente o rendimento do processo de hidrólise enzimática não se deve avaliar somente o aumento da concentração final de glicose quando se emprega maiores cargas de enzimas e de sólidos, uma vez que, os fatores relacionados ao processo produtivo em larga escala, como consumo de potência e eficiência na agitação do meio reacional e custo do complexo enzimático comercial utilizado, influenciam de forma significativa na viabilidade da operação industrial. Corrêa (2016), avaliou o consumo de potência para agitação do meio reacional da hidrólise enzimática, sem adição apenas das enzimas, e constatou o aumento do consumo de potência com o aumento nas cargas de sólidos. Além disso, o mesmo observou que uma alta concentração de sólidos ocasiona a formação de regiões de estagnação no interior do reator, que acarretam na diminuição da eficiência de agitação do meio reacional, reduzindo assim o rendimento da hidrólise enzimática.

Na avaliação da efetividade do aumento da concentração de glicose obtida frente ao aumento nas cargas de sólidos e de enzimas foi realizado a aplicação de teste estatístico para comparar as condições e possibilitar indicar a melhor.

4.5.2 Análise estatística

A comparação entre tratamentos diferentes pode ser realizada aplicando um teste de comparação de médias dos tratamentos, permitindo indicar qual foi o melhor tratamento. O teste de comparação entre diferentes condições mais aplicado na literatura é o teste de Tukey, uma vez que este teste é bastante rigoroso e de fácil aplicação. Portanto, para comparar as nove condições operacionais de hidrólise enzimática avaliadas neste trabalho e indicar a melhor foi empregado o teste de Tukey com um nível de significância de 5%. Para aplicação do teste foi utilizado o *software* estatístico Sisvar.

Nas Tabelas 14, 15 e 16 encontram-se as médias da concentração de glicose para cada condição e os resultados de significância entre as condições avaliadas de 5, 10 e 20 FPU/g_{BCA}, respectivamente, com as cargas de sólidos de 5, 10 e 20% (m/v).

Tabela 14 - Teste Tukey para 5 FPU/g_{BCA} variando a carga de sólidos.

Sólidos	Glicose ± 5,324 (g/L)	Significância
5%	19,395	a1
10%	33,027	a1
20%	58,549	a2

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 15 - Teste Tukey para 10 FPU/g_{BCA} variando a carga de sólidos.

Sólidos	Glicose ± 6,409 (g/L)	Significância
5%	24,059	a1
10%	50,420	a2
20%	77,415	a3

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 16 - Teste Tukey para 20 FPU/g_{BCA} variando a carga de sólidos.

Sólidos	Glicose ± 6,515 (g/L)	Significância
5%	43,542	a1
10%	89,820	a2
20%	94,163	a2

Fonte: Do autor (2019).

Os resultados contidos na Tabela 14 demonstra que estatisticamente foi significativo apenas o aumento na carga de sólidos de 10 para 20%. Na Tabela 15 observa-se que foi significativo a diferença na concentração obtida de glicose entre as três cargas de sólidos empregadas. Já na Tabela 16 nota-se a significância apenas no aumento de 5 para 10% na carga de sólidos.

Também foi avaliado estatisticamente, utilizando o teste de Tukey com nível de significância de 5%, o efeito do aumento na carga de enzimas na concentração de glicose obtida. As Tabelas 17, 18 e 19 apresentam as médias da concentração de glicose e a significância para as cargas de sólidos de 5, 10 e 20 % (m/v), respectivamente, variando a carga enzimática em 5, 10 e 20 FPU/g_{BCA}.

Tabela 17 - Teste Tukey para 5% de sólidos variando a carga enzimática.

Enzimas	Glicose \pm 4,231 (g/L)	Significância
5 FPU/g _{BCA}	19,395	a1
10 FPU/g _{BCA}	24,059	a1
20 FPU/g _{BCA}	43,542	a2

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 18 - Teste Tukey para 10% de sólidos variando a carga enzimática.

Enzimas	Glicose \pm 6,340 (g/L)	Significância
5 FPU/g _{BCA}	33,027	a1
10 FPU/g _{BCA}	50,420	a1
20 FPU/g _{BCA}	89,820	a2

Fonte: Do autor (2019).

Os resultados contidos nas Tabela 17 e 18 demonstram que estatisticamente foi significativo a diferença na concentração de glicose obtida apenas no aumento da carga de enzimas de 10 para 20 FPU/g_{BCA}.

A condição de 20% de sólidos com 5, 10 e 20 FPU/g_{BCA} apresentou ambiguidade no resultado do teste de Tukey, ou seja, o mesmo não conseguiu diferir entre as diferentes condições avaliadas. Sendo assim, conforme apresentado na literatura foi realizado o teste de Scott e Knott com nível de significância também de 5% para eliminar a ambiguidade do teste de Tukey. Na Tabela 19 encontra-se a média da glicose e a significância para a carga de sólidos de 20% com 5, 10 e 20 FPU/g_{BCA} de carga enzimática.

Tabela 19 - Teste Scott-Knott para 20% de sólidos variando a carga enzimática.

Enzimas	Glicose \pm 6,988 (g/L)	Significância
5 FPU/g _{BCA}	64,404	a1
10 FPU/g _{BCA}	77,415	a1
20 FPU/g _{BCA}	94,163	a2

Fonte: Do autor (2019).

Os resultados contidos na Tabela 19 demonstram o mesmo comportamento observado para as cargas de sólidos de 5 e 10%, em que houve significância apenas no aumento de 10 para 20 FPU/g_{BCA} na carga enzimática.

Portanto, pode-se observar por meio dos resultados obtidos da análise estatística das condições avaliadas que para a carga enzimática de 10 FPU/g_{BCA} (Tabela 15) houve significância entre as três cargas de sólidos aplicadas, ou seja, esta carga enzimática demonstra melhor rendimento para a hidrólise enzimática do BCA explodido. Já quando se observa os resultados obtidos para o efeito do aumento na carga de enzimas (Tabelas 17, 18 e 19), o aumento teve significância apenas nas cargas mais altas de enzimas, de 10 para 20 FPU/g_{BCA}.

Na avaliação da efetividade do aumento da carga de sólidos e enzimas para liberação de glicose também foi avaliado a produtividade de glicose, pois este fator evidencia melhor o aumento ou não do rendimento da etapa de hidrólise. No próximo item desta seção encontra-se a análise acerca da produtividade obtida para as diferentes condições operacionais avaliadas neste trabalho.

4.5.3 Produtividade

O cálculo da produtividade (P) ao longo da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) foi realizado empregando a Equação 2.

$$P = \frac{C_{Glicose}}{t} \quad (2)$$

Em que:

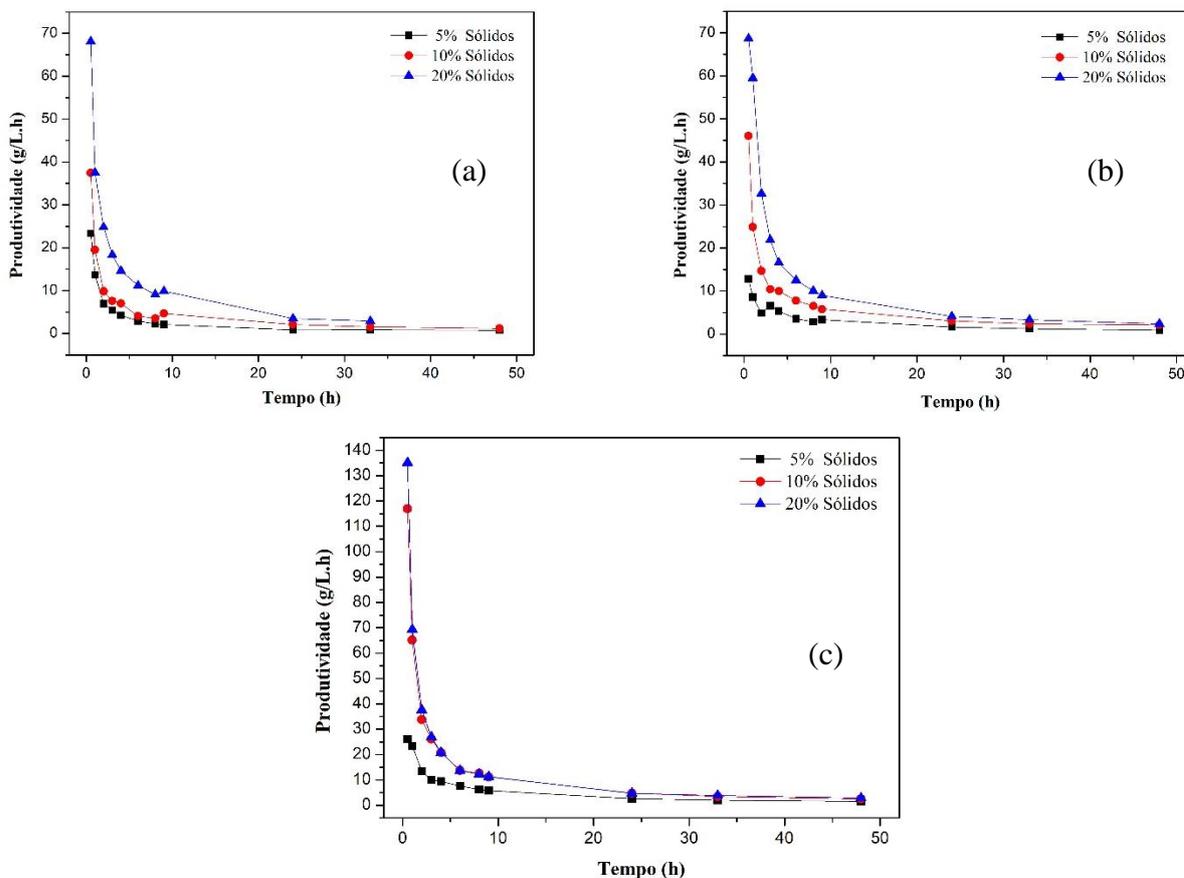
P – produtividade (g/L.h);

C_{Glicose} – concentração de glicose (g/L);

t – tempo de hidrólise enzimática (h).

A Figura 11 apresenta respectivamente os gráficos do perfil de produtividade ao longo da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar explodido para as nove condições operacionais avaliadas, correspondente às cargas de enzimas de 5, 10 e 20 FPU/g_{BCA} com 5, 10 e 20% (m/v) de carga de sólidos.

Figura 11 - Perfil de produtividade de glicose ao longo da hidrólise para as cargas de enzimas de (a) 5, (b) 10 e (c) 20 FPU/g_{BCA} e cargas de sólidos de 5, 10 e 20%.



Fonte: Do autor (2019).

Os resultados obtidos demonstram que a produtividade de glicose apresenta um pico inicial, decaindo ao longo da reação para todas as condições avaliadas, observação coerente, uma vez que a disponibilidade de celulose para ser convertida a glicose diminui no decorrer da reação enzimática, acarretando em valores mais baixos de produtividade ao final da etapa de hidrólise. Pode-se observar que a configuração de 20 FPU/g_{BCA} (Figura 11 – c) resultou inicialmente nos valores mais altos de produtividade, no entanto, ao final da hidrólise os valores ficaram próximos aos obtidos na condição de 10 FPU/g_{BCA} (Figura 11 – b).

O comportamento observado foi coerente, já que a maior conversão de celulose em glicose ocorreu no início do processo, na fase logarítmica da hidrólise enzimática, premissa que corrobora com os resultados obtidos para a produtividade de glicose obtida nas condições avaliadas deste trabalho.

Portanto, constata-se que o aumento na carga de sólidos e de enzimas resultaram em maiores valores de produtividades. Todavia a diferença entre a produtividade obtida com cargas enzimáticas e de sólidos mais altas foi menor, como observado por Souza (2014). Além disso,

no estudo da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, Rabelo (2010) constatou que existe uma quantidade de enzima necessária para obter o máximo rendimento de glicose, isto é, não há relação de melhora significativa na produtividade de glicose em toda faixa de concentração de enzima.

Uma alternativa para aumentar a produtividade é a realização da hidrólise em batelada alimentada, adicionando sólidos em tempos pré-determinados, diminuindo assim os problemas relacionados à transferência de massa, além de possibilitar a redução da carga enzimática empregada e reduzir o consumo de potência para agitação devido à redução da viscosidade aparente durante o processo. Ademais, a adição de sólidos ao longo da hidrólise diminui também a possibilidade de ligações improdutivas entre a enzima e a lignina.

Segundo Ramachandrya et al. (2013), outra estratégia para obtenção de aumento na conversão de celulose a glicose frente a utilização de altas cargas de sólidos é a adição de esferas ao meio reacional, melhorando o processo de mistura do mesmo.

Assim sendo, o efeito de elevadas concentrações de sólidos no processo de hidrólise apresenta um efeito mais expressivo quando comparado à carga enzimática, acarretando em maior concentração de glicose ao final do processo de hidrólise, e conseqüentemente, uma maior conversão de celulose em glicose. No entanto, altas cargas de sólidos podem acarretar alguns problemas operacionais durante o processo produtivo, que compreende ao aumento do consumo de energia devido à alta viscosidade inicial do meio, além da queda na conversão de celulose.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas, como o bagaço de cana-de-açúcar, se apresenta como uma ótima oportunidade de reaproveitamento de resíduos industriais e agrícolas, além da contribuição ambiental e econômica gerada pela produção do E2G. Sendo assim, os estudos acerca do processo produtivo do E2G são fundamentais para obtenção de condições que melhorem a viabilidade técnica e econômica do processo.

A etapa de hidrólise enzimática tem uma expressiva influência sobre o rendimento global do processo, uma vez que, nesta etapa ocorre a conversão da celulose, por meio da ação enzimática, a glicose, que segue para a etapa de fermentação sendo convertida a etanol. Deste modo, o estudo das variáveis que envolvem este processo, como a concentração de enzimas e de sólidos estudadas neste trabalho, são indispensáveis para a otimização da produção de E2G.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem compreender melhor a influência da carga de sólidos e de enzimas na obtenção de glicose a partir da celulose da biomassa. A avaliação da carga de enzimas tem grande interesse industrial, pois os complexos enzimáticos comerciais apresentam elevado custo para o processo. Sendo assim, o emprego de quantidades menores de enzimas e a diminuição do tempo de hidrólise enzimática corroboram para a obtenção de maior rendimento e viabilidade técnico-econômica na produção de E2G.

O aumento na carga de enzimas resultou no aumento da produtividade de glicose, todavia para cargas mais altas de sólidos esse aumento apresentou menor representatividade. Na literatura alguns estudos, como de Mendes et al. (2012) e Rabelo (2010), avaliaram cargas mais altas de enzimas observando que existe um limite no aumento da carga de enzimas, pois acima desse marco o aumento nesta carga não exerce efeito significativo no rendimento da hidrólise enzimática.

Desta forma, sendo a etapa de hidrólise um dos estágios fundamentais para se alcançar maiores rendimentos na produção de etanol, recomenda-se estudos das demais variáveis que influenciam o rendimento da hidrólise enzimática, como agitação, temperatura, pH, tipo de substrato e de enzimas. Além disso, sugere-se também a utilização de métodos mais eficazes na quantificação da glicose formada na hidrólise da celulose, como o método CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). A utilização de métodos eficazes para cessar a ação enzimática também podem trazer resultados com maior confiabilidade, pois a centrifugação ineficiente pode permitir que sólidos sejam armazenados juntamente com a enzima presente nas amostras coletadas, possibilitando que volte a ocorrer a reação enzimática nos momentos de descongelamento para análise das respectivas amostras.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizado o estudo do efeito da carga de sólidos e de enzimas na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo método de explosão a vapor. Os resultados experimentais permitiram identificar que tanto o aumento na carga de sólidos quanto de enzimas resultou no aumento da concentração final de glicose. No entanto, observou-se que a produtividade não aumentou de maneira significativa com aumento da carga de sólidos, principalmente entre as cargas de 10 e 20%. Deste modo, como a concentração de glicose ao final da etapa de hidrólise tem grande importância, visto que possibilita a obtenção de vinhos com maiores teores alcoólicos, deve-se buscar um equilíbrio entre a carga de sólidos e a produtividade ao longo da hidrólise enzimática, objetivando maiores conversões de celulose e elevados rendimentos do processo.

Nas condições avaliadas neste trabalho, o experimento realizado com carga de enzimas de 10 FPU/g_{BCA} apresentou melhor significância estatística frente o aumento na carga de sólido, além de resultar na melhor relação de concentração final de glicose e produtividade de glicose. Nesta carga enzimática e 10% de carga de sólidos foi obtida a melhor condição operacional para hidrólise enzimática do bagaço explodido, resultando na concentração de glicose de 101,693 g/L \pm 8,436, em 48 h de hidrólise. A escolha da melhor condição operacional também levou em consideração o custo do complexo enzimático comercial e o consumo de potência para agitação do meio reacional na produção em larga escala de E2G.

Portanto, a análise da melhor condição operacional a ser empregada na hidrólise deve levar em consideração os custos com o processo de agitação do meio reacional, o volume dos biorreatores, o complexo enzimático utilizado, o sistema de operação (por exemplo batelada e batelada alimentada), além da análise de todas as etapas da produção do E2G interligadas. Tendo em vista os benefícios provenientes da inserção do E2G na matriz mundial de combustíveis, esforços devem ser direcionados no estudo e desenvolvimento de condições operacionais que aumentem o rendimento e a viabilidade técnico-econômica do processo produtivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANFAVEA - Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores. Disponível em: <<http://www.anfavea.com.br/>>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Biocombustíveis**. 2019. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis>>. Acesso em: 16 de abril de 2019.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Resolução ANP N° 19, DE 15.4.2015 – DOU 16.4.2015**. 2015. Disponível em: <<http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-anp/2015/abril&item=ranp-19-2015>>. Acesso em: 02 de maio de 2019.

BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. Progress in Bioethanol Processing. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 34, p. 551-573, 2008.

CANILHA, L. et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n. 44, p. 50, 2009.

CARLY, C. M. de. **Hidrólise e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar em escala de bancada para produção de etanol 2G**. 2011. 97 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2011.

CNPEN - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais. **Etanol de segunda geração pode dar independência energética ao país**. 2015. Disponível em: <<http://cnpem.br/etanol-2g-independencia-energetica-pais/>>. Acesso em: 14 de maio de 2019.

CORRÊA, L. J. **Estudos de melhorias no processo de hidrólise enzimática de biomassas para produção de etanol**. 2016. 131 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2016.

FARIAS, D. **Produção de etanol de segunda geração por *Scheffersomyces stipitis* a partir de pentoses em processo extrativo à vácuo**. 2014. 263 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2014.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Appl. Chem.**, v. 59, n. 02, p. 257-268, 1987.

GOUVEIA, E.R., NASCIMENTO, R. T., ROCHA, G.J.M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, p. 1500-1503, 2009.

HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-, and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 22, p. 384-410, 2005.

JARDIM, H. A. S. P. M. **Projeto, construção e desenvolvimento metodológico de um aparelho de destilação. Estudo de caso: produção de etanol anidro via destilação extrativa utilizando glicerol**. 2014. 130 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Centro de Ciências Exatas e Tecnologia – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2014.

LÓPEZ-LINARES, J. C. et al. Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. **Fuel**, v. 122, p. 112-118, 2014.

LUCARINI, A. C. et al. Estudo da hidrólise enzimática da palha de cana de açúcar para produção de etanol de segunda geração. **The Journal of Engineering and Exact Sciences – JCEC**. v. 03, n. 02, p. 242-253, 2017.

LUCON, O.; GOLDEMBERG, J. Energias renováveis: um futuro sustentável. **REVISTA USP**, São Paulo, v. 72, p. 6-15, 2006.

MACEDO, I. C. **Geração de energia elétrica a partir de biomassa no Brasil: atuação atual, oportunidades e desenvolvimento**. 2001. 12 p. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos – CGEE. Brasília. 2001.

MARTINS, F. A. et al. A produção do etanol de segunda geração a partir do bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Latino-Americana de Inovação e Engenharia de Produção**, v. 2, n. 3, p. 5-16, 2014.

MENDES, T. D. et al. **Avaliação da hidrólise enzimática de *Bachiaria brizantha* utilizando complexo enzimático comercial**. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, Búzios, 2012.

MESA, L. et al. An approach to optimization of enzymatic hydrolysis from sugarcane bagasse based on organosolv pretreatment. **J Chem Technol Biot**, v. 85, p. 1092-1098, 2010.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOOD, S. H. et al. Lignocellulosic Biomass to Bioethanol, a Comprehensive Review with a Focus on Pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 27, p. 77-93, 2013.

MORO, M. K. **Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar por extrusão com dupla-rosca**. 2015. 119 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2015.

MUSSATO, S. I. et al. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Cellulose**, v. 15, p. 711-721, 2008.

NOVA CANA. **BNDES: custo de produção de etanol 2G será menor do que de 1G até 2020**. 2015. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/bndes-custo-producao-etanol-2g-menor-1g-2020-240315>>. Acesso em: 23 de abril de 2019.

NYKO, D. et al. A corrida tecnológica pelos biocombustíveis de segunda geração: uma perspectiva comparada. **Biocombustíveis**, BNDES *Setorial* v. 32, p. 5-48, 2010.

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

OLIVEIRA, F. M. **Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com uréia**. 2011. 100 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual do Sudeste da Bahia. Itapetinga. 2011.

PITARELO, A. P. **Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor**. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2013.

PITARELO, A. P. et al. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1502-1509, 2012.

PRATTO, B. **Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar: Estudo cinético e modelagem matemática semi-mecanística**. 2015. 130 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Universidade Federal de São Carlos. São Paulo. 2015.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2010.

RABEMANOLONTSOA, S.; SAKA, H. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, v.199, p.83-91, 2016.

RAMACHANDRIYA, K. D. et al. Effect of high dry solids loading on enzymatic hydrolysis of acid bisulfate pretreated Eastern redcedar. **Bioresource Technol**, v. 147, p. 168-176, 2013.

ROSA, S. E. S. da.; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, n. 32, p. 117-156, 2009.

SAAD, M. B. W. **Avaliação técnica e econômica preliminar da produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 138 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo. Lorena. 2010.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.

SILVA, G. M. da. **Avaliação de diferentes configurações de hidrólise enzimática e fermentação utilizando bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol 2G**. 2015. 142 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2015.

SILVA, J. A. da. **Catálise enzimática na produção de etanol de segunda geração**. 2016. 27 p. Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química). Universidade Federal de São João del-Rei. São João del-Rei. 2016.

SILVA, M. D. da. **Produção de etanol de segunda geração por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 a partir da hidrólise ácida de sabugo de milho (*Zea mays L.*)**. 2018. 101 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto. 2018.

SOUZA, R. B. A. de. et al. **Avaliação do efeito da carga de sólidos sobre a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar e comparação entre complexos enzimáticos comerciais**. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, Florianópolis, p. 1-7, 2014.

SOUZA, R. F. R. de. **Produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático do bagaço de cana-de-açúcar por leveduras isoladas do bioma amazônico**. 2014. 66 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Centro de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2014.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis process for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**. v. 2, p. 707-738, 2007.

UNICA - **União da Indústria de Cana-de-Açúcar**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/?idioma=1>>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

VASCONCELOS, N. M. de.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. S. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico: Histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. Embrapa Agroindústria Tropical, **Boletim de pesquisa e desenvolvimento** v. 88, p. 1-25, 2013.

ZENG, Y. et al. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 27, p. 38-45, 2014.